

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**BESTIMMUNG DER DNA EINZELSTRANGBRUCH-RATE
BEI RAUCHERN UND NICHTRAUCHERN
MIT DER METHODE DER NUCLEOID-SEDIMENTATION**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Bianca Wittig
aus Heidelberg

MAINZ 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554409_0008

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**BESTIMMUNG DER DNA EINZELSTRANGBRUCH-RATE
BEI RAUCHERN UND NICHTRAUCHERN
MIT DER METHODE DER NUCLEOID-SEDIMENTATION**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Bianca Wittig
aus Heidelberg

MAINZ 1987

Dekan: Professor Dr.med. M.Thele

1. Gutachter: Prof.Dr.med. R.K.Zahn
2. Gutachter: Prof.Dr.med.Dr.med.vet.
K.H.Meyer zum Büschenfeld

Tag der Promotion: 21.12.1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
1.1 Zur Geschichte	6
1.2 Die zahlenmäßige Bedeutung	6
1.3 Das Bronchialkarzinom	7
1.4 Andere Krebsmanifestationen	8
1.5 Karzinogenese	9
1.6 Nachweismethoden von DNA-Schäden	11
1.7 Die Nukleoid-Sedimentation	12
2. Material und Methode	14
2.1 Probanden	14
2.2 Fragebogen	15
2.3 Methoden	16
2.3.1 Lymphozyten-Trennung	16
2.3.2 Nukleoid-Sedimentation	17
2.4 Bestrahlung der Lymphozyten	19
2.5 Abwandlungen zur Optimierung der Methode	21
2.6 Statistische Methodik	23
3. Ergebnisse	25
3.1 Verteilung der Probanden	25
3.2 Rauchverhalten der Probanden	27
3.3 Ergebnisse der Nukleoid-Sedimentation	29
3.3.1 Gesamtdarstellung	29
3.3.2 Exraucher	30
3.3.3 Raucher	33
3.3.4 Geschlecht	36
3.3.5 Zigarettenzahl und Rauchdauer	38
3.3.6 Peakhöhe	41
3.3.7 Langzeitbeobachtungen	42
3.4 Fragen zu Umweltnoxen	44
3.4.1 Befinden	44
3.4.2 Passivrauchen	44
3.4.3 Genetische Belastung	47
3.4.4 Medikamente	47
3.4.5 Kaffee	47
3.4.6 Würzen	48

	Seite
3.4.7 Alkohol	50
3.4.8 Alter	51
4. Diskussion	52
4.1 Problemstellung	52
4.2 Rauchen und DNA-Schäden	52
4.2.1 Einzelstrangbrüche	52
4.2.2 Schadenskombinationen	55
4.3 Wirkmechanismen	56
4.3.1 Die komplexe Noxe Tabakkondensat	56
4.3.2 Benz-a-Pyren	56
4.3.3 Nitrosamine	57
4.3.4 Grenzen des Reparaturmechanismus	58
4.4 Konstitutionelle Faktoren	59
4.4.1 Genetik	59
4.4.2 Geschlecht	60
4.4.3 Alter	60
4.5 Rauchmenge	61
4.6 Filterzigaretten	61
4.7 Exraucher	62
4.8 Passivraucher	62
4.9 Andere Umweltnoxen	63
4.9.1 Ernährung	63
4.9.2 Alkohol	64
4.9.3 Kaffee	64
4.9.4 Medikamente	65
5. Methodische Perspektiven	66
5.1 Ansätze für die Routine-Anwendung	66
5.2 Anpassung der Methodik	66
5.2.1 Fluoreszenzmessung	66
5.2.2 Entnahmetechnik	67
5.3 Typische Meßergebnisse	67
6. Zusammenfassung	70

7.	Literaturverzeichnis	72
	Materialien	91
	Abkürzungen	92

1. Einleitung

1.1 Zur Geschichte

"...labii carcinoma ibi frequentissimum, ubi homines fistulis tabacinis indulgent.", schrieb Samuel Thomas Soemmering, ein Mainzer Gelehrter, in einem Kapitel "Carcinoma" 1795 über die Zusammenhänge zwischen Tabak und Krebs. Schon vorher hatte John Hill ähnliche Beobachtungen veröffentlicht (Redmond 1970).

200 Jahre später kann man auf die Bewältigung des Krebsproblems noch immer nur hoffen.

1.2 Die zahlenmäßige Bedeutung

1981 waren in der Bundesrepublik Deutschland 21% aller Sterbefälle durch bösartige Neubildungen verursacht, das sind 151.939 (Statistisches Bundesamt 1985). Die stärkste Zunahme aller Krebsmanifestationen zeigte in den letzten 25 Jahren dabei das Bronchialkarzinom, das bei uns seit 1963 beim männlichen Geschlecht die häufigste Krebsodesursache geworden ist (Wagner 1986). Nur 4.6% der Patienten, die an Bronchialkarzinom erkrankten, sind Nichtraucher (Schmähl 1981). In der Bundesrepublik gab es 1981 etwa 16 Millionen Raucher (Schmähl 1981).

Doll und Peto (1976) geben an, daß bei Rauchern insgesamt ein Drittel bis zur Hälfte der Todesfälle diesem gesundheitsgefährdenden Verhalten zuzuordnen sind.

Man muß sich deutlich machen, daß die Mortalitätszahlen die weit höhere Morbidität und alle bisherigen ärztlichen Erfolge ausklammern.

1.3 Das Bronchialkarzinom

Die ersten Beweise für den Zusammenhang zwischen Rauchen und Krebs stützen sich auf epidemiologische Studien. Mit der grundlegenden Arbeit von Doll und Hill 1952 wurde der Kausalzusammenhang zwischen Tabakrauchen und Bronchialkarzinom das erste Mal systematisch untersucht. Seit der Hammond-Studie 1966 gilt der Zusammenhang zwischen Zigarettenrauchen und Lungenkrebs als gesichert. Daraus folgende präventive Maßnahmen wurden besonders weitgreifend vom Terry-Report (US-Department of Health, Education and Welfare 1967) initiiert. Es ist enttäuschend zu sehen, daß es 20 Jahre brauchte, bis sich zumindest in den USA erste Erfolge abzuzeichnen beginnen (Centers for disease control 1987). Einerseits entwickelt sich in bestimmten Bevölkerungsgruppen ein Trend, die Zigarette als Krankheitsursache zu werten. Bei anderen Populationen, besonders Frauen und Jugendlichen, kommt das Rauchen immer stärker auf. Dies wird besonders deutlich durch die Zunahme des Bronchialkarzinoms bei Frauen (Schmähl 1981). Eine Studie des Rauchverhaltens am eigenen Mainzer Gymnasium stellte die Grundlage für die Beschäftigung mit dem Thema Rauchen dar (Wittig 1984).

Histologisch handelt es sich beim Bronchialkarzinom, verursacht durch Rauchen, in der Regel um Plattenepithel-Karzinome (Benhamou et al. 1985, Wu et al. 1985) und Kleinzell-Karzinome (Damber et al. 1986).

Wynder und Hoffmann (1967) haben vermutet, daß es sich bei der Entstehung des Bronchialkarzinoms um einen 3-Schritt-Mechanismus handelt, bei dem ein Verlust des ziliären Abwehrmechanismus die folgende Absorption von Tumor-Initiatoren und -Promotoren erleichtert. Krebs ist das Resultat eines vielschrittigen Prozesses aus Tumor-Initiation, Promotion und Progression (Faber 1984).

1.4 Andere Krebsmanifestationen

In späteren Studien wurde die Beziehung zum Rauchen auch für andere Krebsmanifestationen belegt. Besonders hervorgehoben werden die prospektiven Studien von Kahn (1966), Weir und Dunn (1970) und Doll und Peto (1976).

Als epidemiologisch gesichert gilt ein ursächlicher Anteil des Zigarettenrauchens an Krebstoten zwischen 30% (Hammond und Seidman 1980) bis 39% (Gonzalez et al. 1985); auch Pfeifenraucher haben hier gegenüber Nichtrauchern ein erhöhtes Risiko (Hartge et al. 1985).

Karzinome im Nasen-Rachenraum (Mabuchi et al. 1985), das Larynx-Karzinom und das Ösophagus-Karzinom (Fielding 1985) treten bei Rauchern häufiger auf als bei Nichtrauchern. Es besteht eine Dosis-Wirkungs-Beziehung (Mabuchi et al. 1985).

Für das Nierenzellkarzinom wurde zuletzt in der Los Angeles County Cancer Studie für männliche Zigarettenraucher ein hohes relatives Risiko gefunden (Yu et al. 1986). Auch beim Pankreas-Karzinom war für Zigarettenraucher ein erhöhtes Risiko erkennbar (Mack et al. 1986). Für Brustkrebs (Rosenberg et al. 1984, Schechter et al. 1985) und Leberzell-Karzinom (Austin et al. 1986, Trichopoulos et al. 1987) sind die Ergebnisse bisher widersprüchlich.

Hammond und Seidman zeigten 1980 in Fortführung der Hammond-Studie 1966 daß 25-35% der Krebsmortalität von Männern in den USA hauptsächlich auf das Tabakrauchen zurückzuführen ist. Dieselben Ergebnisse erhielten 1981 Doll und Peto in einer Zusammenstellung, nach der Tabakrauchen 30% der Krebstodesfälle verursacht.

Neben dem Tabak gibt es auch andere gewichtige Krebsnoxen. Als Einzelursache wird es kaum etwas ähnlich Gravierendes geben wie das Zigarettenrauchen (Hammond und Seidman 1980). Bisher sind keine therapeutischen Ansätze

zu erkennen, die dem Problem dieser Zahlen gerecht werden. Besonders beim Bronchialkarzinom sind die Aussichten auf rechtzeitige Erkennung und Heilung noch gering. Nach dem Krebsforschungszentrum Heidelberg (Abel 1985) beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung heute 11%.

1.5 Karzinogenese

Das Ziel der Grundlagenforschung ist es, durch Erkennen der Pathomechanismen, die den Karzinomerkrankungen zugrunde liegen, wissenschaftlich fundierte Aussagen zu machen und Gesundheitsgefahren zu erfassen.

Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß zu Beginn der Karzinogenese ein mutagenes Ereignis steht, verursacht durch eine Veränderung der DNA durch ultimale Karzinogene (Miller und Miller 1981). Schon 1973 entwickelte Ames einen auf Salmonellenkulturen basierenden Mutationstest, der für zahlreiche Substanzen, die bekannterweise kanzerogen sind, eine hohe Mutationsrate nachwies. Heute kennt man eine Reihe weiterer in-vitro-Testsysteme, die eine DNA-Schädigung durch chemische Substanzen nachweisen (Tennant et al 1987). Die Übertragung dieser Ergebnisse auf das Risiko der Menschen ist jedoch noch offen (Ames et al. 1987).

Als Primärläsion der DNA kennt man Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche, Basenschäden, Alkylierung der DNA, Radikal-Bildung, Interkalierung, Thymindimere und andere (Obe et al. 1982, Cerutti 1985). Der häufigste Schaden ist dabei ein Bruch in einem der beiden DNA-Stränge: Ein Einzelstrangbruch (SSB) (Zahn 1985).

Als biologische Notwendigkeit korrekter Genübertragung besitzen eukaryote Zellen ein leistungsfähiges Reparatursystem für DNA-Läsionen (Bender 1980). Einzelstrangbrüche werden damit normalerweise schnell repariert

(Bender 1980). Erst ein Fehler in beiden DNA-Strängen, der über den Zellzyklus hinaus bestehen bleibt, führt zu einem irreversiblen Schaden des Erbguts. Dabei kann entweder direkt ein Doppelstrangbruch, z.B. durch Röntgenstrahlen, entstehen oder ein Einzelstrangbruch durch fehlerhafte Reparatur und nachfolgende Fixierung während der Replikation manifest werden (Obe et al. 1982). Die meisten chemischen Karzinogene verursachen DNA-Schäden über den Einzelstrangbruch (Obe et al. 1982).

Für eine Reihe rezessiv-vererbter Krankheiten ist es bekannt, daß sie mit erhöhter Krebsinzidenz gekoppelt sind. Bei einigen dieser Erkrankungen, z.B. Xeroderma pigmentosum, fand man einen Reparaturdefekt für bestimmte physikalische und chemische Schäden (Setlow 1980). Als Beweis dafür, daß DNA-Schäden karzinogen sein können, und für die enge Beziehung zwischen mutagenen und karzinogenen Substanzen, sieht Setlow (1978) die Existenz derartiger Störungen. Die aus Einzelstrangbrüchen entstandene Mutation kommt nur unter bestimmten Voraussetzungen zum Tragen.

Chemische und physikalische Noxen wirken ungezielt zufällig verteilt auf die DNA ein. Bei der Frage nach spezifischer DNA-Struktur und Gen-Loci, die die maligne Transformation einer Zelle erklären können, geht man heute von der Existenz von Krebsgenen als evolutionär vorgegebener Bestandteil des genetischen Apparats aus (Klein und Klein 1985, Bishop 1987). Dabei unterscheidet man dominant transformierende Gene, die durch Aktivierung zellulärer Protoonkogene entstehen und deren Funktion für die gesunde Zelle in der Regulation von Zellteilung, Zellwachstum und -differenzierung besteht (Weinberg 1985, Goustin et al. 1986, Bishop 1987). Protoonkogene können durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden: Mutation, Rearrangement oder Translokation, Gen-Amplifikation oder Überexpression (Bishop 1987). Für das kleinzellige

Bronchialkarzinom konnte das gehäufte Auftreten amplifizierter myc-Gene gezeigt werden (Johnson et al. 1987).

Dem gegenüber stehen die Anti-Onkogene oder Tumor-Suppressor-Gene, die von ihnen kontrollierte Zellregulationsmechanismen außer Kraft setzen können (Green et al. 1985, Klein 1987). Als Prototyp ist das kürzlich klonierte Retinoblastom-Gen zu erwähnen (Fung 1987).

Wie schon in gesunden Zellen Zellteilung und -differenzierung durch mehrere Gene kontrolliert werden, sind nach Klein und Klein (1985) bei der Karzinogenese mehrere mutationsähnliche Veränderungen erforderlich.

Die vorgeschlagenen Mechanismen lassen sich in Beziehung setzen zu dem vielfältigen Bild der Manifestationen des Krebses.

1.6 Nachweismethoden von DNA-Schäden

Entsprechend der Bedeutung der Einzelstrangbrüche bei der Karzinogenese sind unterschiedliche Nachweismethoden von DNA-Alterationen zur genotoxischen Risikoabschätzung entwickelt worden.

Zahn (1986) hat folgende Methoden zusammengestellt, wobei er sich bei fast allen auf eigene experimentelle Erfahrung stützt.

Nachweis von DNA-Alterationen:

1. Alkalische Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (Lehman und Ormerod 1970)
2. Alkalische Filterelutionstechnik (Kohn et al. 1976)
3. Alkalische Entwindungstechnik mit Hydroxyapatit-Differenzierung (Kanter und Schwartz 1979)
4. Fluoreszenz-Analyse der alkalischen Entwindung (Birnboim und Jewcak 1981)
5. Relaxation supergetwisteter ringförmiger DNA (Stüber 1986)

6. Nukleoid-Sedimentationstechnik (Cook und Brazell 1975)
7. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungsänderung von DNA mit dem Elektronenmikroskop (Zahn 1983)

1.7 Die Nukleoid-Sedimentation

Die von Cook und Brazell 1975 erstmals beschriebene und bisher mehrmals an Zellkulturen bestätigte Nukleoid-Sedimentation wurde von uns in einer Feldstudie eingesetzt. Es war das Ziel, beim Tabak, einer epidemiologisch gesicherten Krebsnoxen, den Mechanismus der Karzinogenese auf der Ebene der DNA aufzuzeigen. Die theoretische Grundlage der Methode ist weitgehend geklärt.

Ausgehend von den grundlegenden Publikationen von Cook und Brazell (1975) wurde von uns die Methode der Nukleoid-Sedimentation in einem Dichtegradienten modifiziert angewandt.

Durch eine Lyse-Lösung, die das nicht-ionische Detergenz Triton x-100 zur Zerstörung der Zellmembranen und hohe Salzkonzentrationen zur Reduktion des Proteingehalts enthält, werden aus Zellen Nukleotide freigesetzt. Diese Nukleotide enthalten sämtliche DNA und RNA aus dem Zellkern, aber keine Histone und kaum andere Chromatin-Proteine. Die DNA der Nukleotide ist intakt sehr resistent gegen Scherkräfte (Cook und Brazell 1975, 1976, Cook, Brazell und Jost 1976). Im Elektronenmikroskop zeigte sich, daß die DNA der Nukleotide in supergetwisteten Domänen vorliegt, welche durch RNA oder Proteine topologischen Zwängen unterworfen sind, die die freie Rotation eines DNA-Stranges der Doppelhelix um den anderen verhindern (Mullinger und Johnson 1979). Diese hochmolekularen, DNA-angereicherten Nukleotide sind kompakt und sedimentieren daher in einem Saccharosegradienten in der Zentrifuge schnell. Eine Verzögerung der

Sedimentation weist auf den Übergang von kompakter, supergetwisteter DNA-Domäne zur offenen, aufgedrillten DNA-Schleife hin. Die Oberfläche des Nukleoids wird vergrößert und dieses beim Sedimentieren gebremst (Cook und Brazell 1975, 1976, Cook, Brazell und Jost 1976, Cook et al. 1978).

Sehr anschaulich ist hier das Modell von Zahn (Studium generale 1985), der die geschädigten Nukleotide bei der Sedimentation mit einem retardierenden Fallschirm vergleicht.

Eine supergetwistete Domäne relaxiert bei einem Einzelstrangbruch. Der gebrochene Strang rotiert frei um den Schwester-Strang. Die Sedimentationsgeschwindigkeit sinkt mit zunehmender Anzahl an Einzelstrangbrüchen. Eine vollständige Aufdrillung der DNA eines Nukleoids geschieht bei etwa 10^4 Einzelstrangbrüchen (Cook und Brazell 1975).

Die Methode ist geeignet, empfindlich Einzelstrangbrüche in menschlichen Zellen - induziert von kanzerogenen Noxen - durch Abnahme der Sedimentationsgeschwindigkeit nachzuweisen.

Material und Methode

2.1 Probanden

Die Probanden stammen aus zwei Bereichen. Aus dem Bekanntenkreis wurden 6 Raucher und 11 Nichtraucher zur Mitarbeit gewonnen und die Methode durch Mehrfachuntersuchungen über 8 Monate kontrolliert. Um eine größere Population zu erreichen und einer Zufallsverteilung näher zu kommen, erbaten wir die Unterstützung der betriebsärztlichen Dienststelle der Mainzer Universität. Durch das Interesse und die Hilfsbereitschaft der Leiterin, Frau Dr. P. Beyermann, war es uns möglich, anlässlich der routinemäßigen Kontrolluntersuchung Universitätsbedienstete zur Mitarbeit zu gewinnen.

Auf diese Art konnten wir weitere 21 Raucher und 11 Nichtraucher ansprechen. Alle zu vorher festgelgten Terminen erscheinenden Personen stimmten zu.

Die Probanden wurden über unser Vorhaben informiert und füllten den Fragebogen aus. Es wurden 10 ml Vollblut abgenommen. Sie waren zwischen 16 und 56 Jahren alt und verteilten sich entsprechend ihrer Altersgruppen folgendermaßen:

Alters- gruppe	bis 25	bis 35	bis 45	über 45	Jahre

Anzahl	15	19	9	6	
Gesamtzahl	49 Probanden				

46 der Versuchspersonen waren klinisch ohne Befund. 3 Probanden gaben an, regelmäßig Antiphlogistika und/oder Glukokortikoide einzunehmen.

Für die Versuche erhielten die Probanden eine Kennzahl, über die sie für die Betriebsärztin identifizierbar sind.

2.2 Fragebogen

Genauere Information zu den Probanden wurde in einem Fragebogen (Abb.1) erfaßt. Dieser mußte sich ohne zeitlichen Aufwand in die betriebsärztliche Untersuchung eingliedern lassen. Wir beschränkten uns daher auf elf Fragen.

Bei Konzept und Gestaltung war uns die freundliche Beratung von Herrn Dr.W.Donsbach, Institut für Publizistik, eine große Hilfe.

Abb.1 Fragebogen

Erfassungsbogen zum Thema "Rauchgewohnheiten"

1. Einmal alles in allem: Fühlen Sie sich im Grunde genommen
gesund oder nicht? sehr gesund { }
 im wesentlichen gesund { }
 fühle mich krank { }

2. Leben oder arbeiten Sie mit regelmäßigen Rauchern (über 20
Zigaretten am Tag) zusammen? ja () nein ()

3. Wieviele Ihrer Blutsverwandten haben oder hatten Ihres Wissens
Krebs { }
Herzinfarkt/
Angina pectoris { }

4. Nehmen Sie häufig oder regelmäßig welche der aufgeführten
Medikamente? Kortison { } Anti-Babypille { }
 Rheumamittel { } Zytostatika { }

5. Wieviele Tassen Kaffee trinken Sie durchschnittlich am Tag? - - -

6. Essen Sie gerne scharf gewürzt? ja () nein ()

7. Trinken Sie regelmäßig Alkohol? ja () nein ()

8. Wie steht es bei Ihnen mit dem Rauchen? Welche Feststellung
trifft auf Sie zu?
Ich habe nie richtig geraucht { } Bitte weiter mit Frage 11
Ich bin Exraucher { } Frage 9
Ich bin Raucher { } Frage 10

Für Exraucher

9a. Seit wieviel Jahren rauchen Sie nicht mehr? Seit ca. - - - Jahren

9b. Wenn Sie Zigarettenraucher waren; Wieviele Zigaretten haben
Sie täglich geraucht?
bis 10 () bis 20 () bis 30 () bis 40 () mehr ()
Bitte weiter mit Frage 11

Für Raucher

10a. Was rauchen Sie? Pfeife () Zigarre/Zigarillo () Zigaretten ()
 Selbstgedrehte ()
 - Wieviele Tage reicht ein Päckchen? - - -

10b. Wieviele Zigaretten rauchen Sie täglich?
bis 10 () bis 20 () bis 30 () bis 40 () mehr ()

10c. Seit wann rauchen Sie diese Anzahl? Seit ca. - - - Jahren

10d. Haben Sie früher mehr () weniger () gleich viel () geraucht

10e. Rauchen Sie überwiegend Filterzigaretten? ja () nein () beides ()

10f. Welche Zigaretten-Marke bevorzugen Sie? (Bitte eintragen)

- - - - -

Für alle Befragten

11. Ihr Alter? (Bitte eintragen) - - -

12. Ihr Geschlecht? männlich () weiblich ()

Vieler Dank für Ihre Mitarbeit !

Die einleitende Frage sollte die Probanden einstimmen, ihr Gesundheitsverhalten zu reflektieren. Mit Frage 2 und 3 wollten wir das Ausmaß genetischer und umweltbedingter Belastungen zusätzlich zum individuellen Umgang mit bekannten und diskutierten kanzerogenen Substanzen (Frage 4-7) erfassen. Das Hauptziel des Fragebogen war die Dokumentation der Raucherkarriere der Probanden (Frage 8-10). Eine Quantifizierung der beim Rauchen aufgenommenen Schadstoffmenge (z.B. Inhalationstiefe, Kippenlänge) war mit unserem Untersuchungskonzept nicht vereinbar. Wir benötigten Angaben zu Alter und Geschlecht, um mögliche Unterschiede der Einzelstrangbruch-Rate festzustellen.

2.3 Methode

2.3.1 Lymphozytentrennung

Die Lymphozyten aus peripherem Venenblut dienten als Gewebe, das für Versuchszwecke einfach und in ausreichender Zellzahl zu gewinnen war. Beim erwachsenen Menschen beträgt der Anteil kurzlebiger Lymphozyten (etwa 5 Tage) im Blut nur 5-10%, während 90% auf die langlebigen (500-1500 Tage) entfallen. Im gesunden Blut sind etwa 60-80% T-Lymphozyten und 10-30% B-Lymphozyten (Trepel 1978). Die Lymphozyten sind als Modell für Gewebe geeignet.

Den Probanden wurden 10 ml Venenblut mit einer heparinisierten Spritze (200 IE Heparin/ 10 ml Vollblut) entnommen. Die Lymphozytentrennung führten wir nach der bei Böyum (1968) beschriebenen Methode durch. Das Blut wurde spätestens 90 Minuten nach der Entnahme mit der dreifachen Menge isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und in einem Zentrifugenröhrchen je 10 ml des Gemisches auf 3 ml Ficoll-Ronpacon-Lösung geschichtet. Wir setzten das Röhrchen in die Zentrifuge (Minifuge 2 Heraeus Christ) und zentrifugierten 30 Minuten. Während der

Zentrifugation bildete sich eine Abstufung aus Ficoll und den Blutbestandteilen. Mit einer Pasteurpipette wurde der Lymphozytengradient entnommen. Nach Fuks et al. (1976) bestehen die Lymphozyten, die man bei der Trennung mit Ficoll-Hypaque erhält, bei Normalpersonen durchschnittlich aus 20% B-Lymphozyten und 77% T-Zellen.

Die Lymphozyten wurden in einem Zentrifugenbecher mit 50 ml isotonischer NaCl-Lösung verdünnt und weitere 15 Minuten bei 20° Celsius und 250 g in der Minifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesogen und das Pellet in einem Gesamtvolumen von 5 ml NaCl-Lösung aufgeschüttelt. Dieser Reinigungsschritt entfernt Reste der Ficoll-Lösung und Thrombozyten aus dem Lymphozyten-Gradient. Aus der Zellsuspension, gefärbt mit Türks Lösung, wurde nach der klinisch üblichen Methode die Zahl der Lymphozyten in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

In einem Zentrifugenröhrchen sedimentieren wir die Lymphozyten-Suspension nochmals 5 Minuten bei 20° Celsius und 250 g. Mit der berechneten Absolutzahl der Lymphozyten wurde eine Zellsuspension der Konzentration 1.0 Mio Zellen/ 100 µl NaCl eingestellt.

Nach der klinischen Ausstrichmethode wurde die Zellsuspension auf Homogenität geprüft.

2.3.2 Nukleoid-Sedimentation

Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde nach der bei Cook und Brazell (1975, 1976) beschriebenen Methode modifiziert angewandt.

In einem Puffer (NaCl 1.95 M, Tris-Puffer 10 mM, EDTA 1 mM in einem Liter, pH 8.0) lösten wir Saccharose in 6 verschiedenen Konzentrationen (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%). Die Gradienten wurden aus den Saccharose-Lösungen von 5-30% in flüssigem Stickstoff hergestellt und tiefgefroren vorrätig gehalten. Die Pufferlösungen wurden

stufenweise gefroren, beginnend mit der höchsten Saccharose-Konzentration. Pro Abstufung wurden 50 µl Ethidium-Bromid (EB) (100 µg/ml) zugefügt.

Die gewaschenen Lymphozyten wurden in 100 µl NaCl mit 400µl Lyse-Lösung (NaCl 1.95 M, Tris-Puffer 2mM, EDTA 0.1 M, Triton x-100 0.5% in einem Liter, pH 8.0) auf die getauten Saccharose-Gradienten geschichtet und 20 Minuten lysiert. Für jeden Probanden wurde eine Referenzprobe hergestellt. Anschließend wurden die Gradienten in der Ultrazentrifuge Beckman Modell L5-65 in dem Rotor SW 40Ti 60 Minuten bei 20° Celsius und 35.000 U/min (RCF=217.500) sedimentiert. Die Ultrazentrifuge lief ohne Bremse aus.

Zur Entnahme der Saccharose-Gradienten saugten wir mit einer Abimed-Pumpe die Gradienten ab, beginnend mit dem tiefsten (=1.Fraktion), und bildeten 12 Fraktionen. Jede Fraktion wurde mit 0.5 ml des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (Diamidino-phenylindol) (100 ng/ml) versetzt (Lipetz et al. 1982).

DAPI bindet sich spezifisch an DNA; Komplexbildung mit RNA ist dagegen sehr selten (Brunk et al. 1979).

Nach frühestens drei Stunden wurde die Fluoreszenz der Fraktionen am Zeiss Fluorimeter PM Q 3 bei 360 nm Anregung und 454 nm Transmission gemessen. Die Fraktion mit dem Fluoreszenz-Peak zeigte den Sedimentationsgrad der Nukleotide im Gradienten an. Zur Absicherung der Gipfel-Position wurden während der Vorversuche die Fraktionen nach der Fluoreszenzmessung als Ausstrich angefärbt. Kernrudimente zeigten sich nur in den Fraktionen mit über den Background erhöhter Fluoreszenz.

2.4 Bestrahlung der Lymphozyten

Zur Kalibrierung der Methode wurden die menschlichen Lymphozyten definierter harter Röntgenstrahlung ausgesetzt. Gamma-Strahlen verursachen Einzelstrangbrüche (SSB) in der DNA; mit der Methode der Nukleoid-Sedimentation lassen sich diese durch die verminderte Sedimentationsgeschwindigkeit nachweisen (Cook und Brazell 1975, 1976). Die Frage nach der Beziehung zwischen energiereichen Strahlen und SSB ist in der Literatur von mehreren Autoren bearbeitet worden:

- * Bereits Schäden verursacht durch 0.12 Gy (Cook und Brazell 1975), bzw. 0.18 Gy (Dugle et al. 1975) zeigen bei der von uns verwandten Methode einen Effekt.
- * Van Rensburg et al. (1985) gehen davon aus, daß 0.01 Gy 1.248×10^{12} SSB/g DNA machen.
- * Der durchschnittliche DNA-Gehalt in Lymphozyten beträgt 8.0×10^{-12} g (Carson 1983).
- * Ausgehend von diesen Zahlen könnte man rein rechnerisch folgern, daß 0.01 Gy 10 SSB/Zellkern verursachen. Angaben von van Rensburg (1985) passen zu diesen Berechnungen.

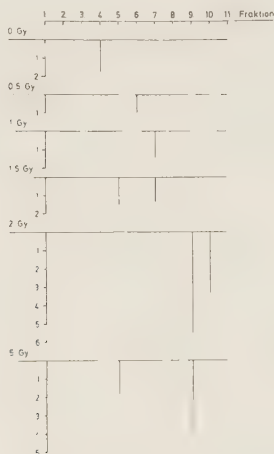
Somit wäre mit der Methode die Größenordnung von etwa 100 SSB/Zelle nachweisbar.

Im Institut für Genetik setzten wir die Lymphozyten in isotonomischer Kochsalz-Lösung Röntgenstrahlen aus (Röntgen-Gerät Müller MG 150-III-G Ia, 1 mm Al-Filter, 10 mA, 120 kV, Focusabstand 10 cm). Wir danken Herrn Prof. Kuhn für seine bereitwillige Unterstützung. Wie in der Literatur beschrieben (Cook und Brazell 1975, Lipetz et al. 1982) wurden die Zellen sofort nach der Bestrahlung lysiert, um die Reparatur der Einzelstrangbrüche zu unterbrechen, und auf Eis gelagert. Nach 20 Minuten Lysezeit wurden die Zellen wie üblich auf einem Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Das Ergebnis von 4 Bestrahlungsversuchen stellt sich folgendermaßen dar.

Bestrahlung der Lymphozyten mit Röntgenstrahlen
(Strahlendosis in Gy)
Lage und relativer Ausschlag der Peaks im Gradienten

Abb.2



Proband 1, weibl., 23 J.,
Nichtraucher, klin.o.B.

Bis zu einer Bestrahlung von 2 Gy nahm die Sedimentationsgeschwindigkeit der Nukleotide im Gradienten gegenüber der unbestrahlten Probe ab. Über 1.5 Gy beobachteten wir zusätzlich das Auftreten von Doppelpeaks und "Klumpen" (erhöhte Fluoreszenz in einer oder mehreren nebeneinander liegenden Fraktionen).

Nach Cook und Brazell (1976) ist bei 10^4 SSB die gesamte Supertwistung eines Nukleotids aufgehoben. Zusätzliche SSB können mit einer Abnahme der Sedimentationsgeschwindigkeit nicht mehr gezeigt werden (Lipetz et al. 1982). In unseren Experimenten lag diese Schwelle bei 2 Gy, zu-

sätzliche Bestrahlung führte sogar zu einer Zunahme der Sedimentationsgeschwindigkeit.

Diese Versuche sind als methodische Kontrolle zu verstehen. Wir wollten uns vergewissern, daß unsere Ergebnisse mit denen anderer Studien hinreichend übereinstimmen.

2.5 Abwandlungen zur Optimierung der Methode

Die bei Cook und Brazell (1975) für Zellkulturen angegebene Vorgehensweise mußte für unsere Bedingungen verändert werden.

Wir experimentierten mit folgenden Parametern.

* Mit dem Ziel der optimalen Peakdarstellung wurden die Saccharose-Konzentrationen und die Anzahl der Gradienten variiert. Anfänglich experimentierten wir mit 6 Konzentrationen zwischen 2.5%-15%. Die Vorversuche zeigten, daß die Nukleotide klinisch gesunder Probanden im Gradienten in der Höhe der 5%-10% Saccharose-Konzentration zu erwarten waren. Deshalb setzten wir Versuchsreihen an (je 6-8 Versuche) mit kleinschrittigen Gradienten der Konzentrationen

- 2, 4, 6, 8, 10, 15 % Saccharose
- 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 % Saccharose
- 2.5, 5, 7.5, 9, 10, 12, 15, 18 % Saccharose

Dabei zeigte sich keine Steigerung der Auflösung; der Peak wurde breiter, ohne daß sich Zwischenpeaks darstellen ließen. Der Gradient mit 5, 10, 15, 20, 25, 30 % Saccharose ergab scharfe Peaks und wurde für die endgültigen Versuche verwandt.

Mit mehrfachen Kontrollen am Polarimeter konnten wir bestätigen, daß die diskreten Konzentrationsabstufungen in eine kontinuierliche Schichtung übergegangen waren.

* Obwohl der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur fluorimetrischen Messung von Nukleinsäuren als spezifischer angesehen wird, war EB als Sedimentierungshilfe

nicht ersetzbar.

Wir legten Versuchsreihen an mit 0, 25, 50, 75, 100 μ l EB (100 μ g/ml) pro Saccharose-Konzentration im Gradienten.

Wie in der Literatur beschrieben (Cook und Brazell 1975) beeinflusste die interkalierende Substanz EB auch in unseren Versuchen die Sedimentationsgeschwindigkeit und die Schärfe der Peaks. Die Konzentration von 50 μ l EB (100 μ g/ml) bewährte sich am besten. DAPI, in unterschiedlichen Konzentrationen direkt mit dem Gradienten eingefroren, verhinderte die Sedimentation der Nukleotide.

* Änderungen der DAPI-Konzentrationen nach der Zentrifugation beeinflussten lediglich den Background. Wir gaben pro Fraktion 0.5 ml DAPI (100 ng/ml) zu.

* Cook und Brazell (1975) erprobten den Einfluß der Pufferkonzentrationen von 1.0 und 1.95 M NaCl auf das Sedimentationsverhalten der Nukleotide. Bei uns bewährte sich 1.95 M NaCl in Puffer und Lyselösung am besten.

* In mehreren Versuchen wurde die Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit zur optimalen Trennung der Zellfraktionen erarbeitet. Zentrifugierzeiten über 60 Minuten bei 35.000 U/min brachten keine weitere Differenzierung der Nukleoid-Fraktion. Nach 30 und 40 Minuten waren die Nukleotide nicht weiter als bis zur Höhe der 2. und 3. Fraktion sedimentiert, ebenso bei 30.000 U/min und 70 Minuten Zentrifugationsdauer.

* In der Vorstellung, daß eine weitere Auftrennung der Nukleotide gesunder Probanden realisierbar sei, wurde die Anzahl der zu messenden Fraktionen von 12 auf 18 und 24 erhöht. Das Fraktionieren ergab keinen Hinweis, daß die ungeschädigten Nukleotide in 0.1 ml NaCl-Lösung mit der Methode der Nukleoid-Sedimentation in Untergruppen zu unterteilen war.

2.6 Statistische Methodik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde im Institut für medizinische Dokumentation und Statistik, Leiter Prof.Dr.J.Michaelis, durch Herrn Dr.M.Berres an einem IBM AT mit dem SAS-Programm vorgenommen. Bei der Endfassung hat mich Prof.Dr.Hommel beraten.

Bei den Experimenten liefen für jeden Probanden parallel zwei Untersuchungen. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Fluoreszenz für jede Fraktion 2 - 11 der Gradienten bestimmt. Wir definierten als Peak eine absolute Fluoreszenz über dem 1.5fachen des Medians. Für die Auswertung wurde der relative Peak

$$P = (\text{Peakhöhe} - \text{Median}) / \text{Median}$$

berechnet.

Als charakteristisch für die einzelnen Fluoreszenzkurven zeigt sich:

- * Die Anzahl der Peaks.
- * Die Anzahl der Klumpen (erhöhte Fluoreszenz über eine oder mehr nebeneinander liegende Fraktionen).
- * Die Lage des ersten, gemittelten und letzten Peaks im Gradienten, gemessen von der 1.Fraktion (entspricht der untersten Fraktion im Zentrifugenröhrchen) bis zur 12.Fraktion.

Der gemittelte Peak im Gradienten wurde berechnet als

$$\text{Summe aus (Lagen x Höhen)} / \text{Summe der Höhen}$$

- * Die Lage des längsten Peaks (der Peak im Gradienten mit der höchsten Fluoreszenz.
- * Die Höhe der Peaks (relative Fluoreszenz in der Fraktion).

Bei der statistischen Auswertung wurde für alle Variablen Mittelwert und Standardabweichung berechnet und graphisch dargestellt. Bei den Variablen "Anzahl der Peaks" und "Anzahl der Klumpen" wurden die Ergebnisse in "Anzahl =1,>1" eingeteilt.

Folgende statistische Tests wurden durchgeführt:

- * t-Tests für quantitative Zielgrößen (Michaelis 1980),
- * exakter Fisher-Test (Michaelis 1980) bzw. Test nach Freeman/Halton (1951) für die Zielgrößen "Anzahl der Peaks, Klumpen",
- * zweifaktorielle Varianzanalyse zur Berücksichtigung von zwei Einflußfaktoren gleichzeitig.

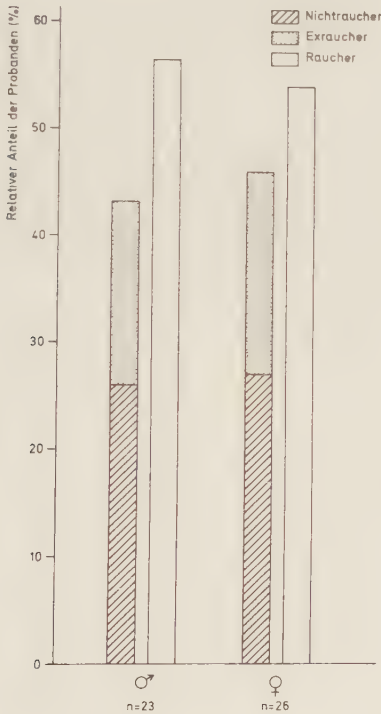
Die Ergebnisse der statistischen Tests wurden in Form von zweiseitigen P-Werten angegeben und sind in deskriptiver Weise zu verstehen.

3. Ergebnisse

3.1 Verteilung der Probanden

Die 49 Probanden waren zu 47% (n=23) männlich, zu 53% (n=26) weiblich. Raucher, Exraucher und Nichtraucher verteilten sich auf Männer und Frauen folgendermaßen.

Abb.3



Rauchverhalten bei männlichen und weiblichen Probanden

	m	w	
Nichtraucher	26	27	%
Exraucher	17	19	%
Raucher	57	54	%

Nichtraucher und Exraucher ergaben zusammen eine mit den Rauchern vergleichbare Anzahl.

Der exakte Fisher-Test zeigte keine Beziehung zwischen Rauchgewohnheiten und Geschlecht.

3.2 Rauchverhalten der Probanden

Von den 49 Probanden waren 22 Nichtraucher (10 männl., 12 weibl.) und 27 Raucher (13 männl., 14 weibl.).

Unter den 22 Nichtrauchern waren 8 Exraucher, die seit 2 Monaten bis 5 Jahren nicht mehr rauchten. Von den Exrauchern hatten sieben bis zu 20 Zigaretten am Tag geraucht.

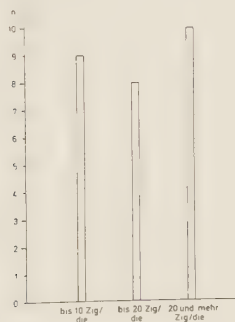
Von den Rauchern rauchten 12 Probanden seit weniger und genau 10 Jahren.

90% der Raucher (n=24) rauchten nur Zigaretten, die anderen (n=3) rauchten Pfeife und Zigaretten. Keiner der Probanden drehte die Zigaretten selbst.

100% der Raucher rauchten Filterzigaretten.

33% (n=9) rauchten bis zu 10 Zig./die, 30% (n=8) bis zu 20 Zig./die und 37% (n=10) mehr als 20 Zig./die.

Abb.4



Anzahl der gerauchten Zigaretten
am Tag

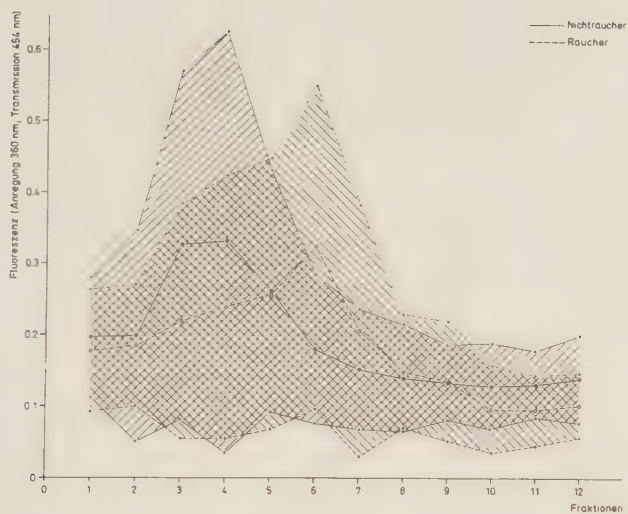
30% (n=8) der Raucher gaben an, früher mehr geraucht zu haben, 22% (n=6) rauchten früher weniger und 48% (n=13) haben seit langem gleich viele Zigaretten geraucht.

Unsere 27 rauchenden Probanden bevorzugten 12 verschiedene Zigarettenmarken, so daß uns eine Einteilung in Raucher "leichter Zigaretten" und solcher mit hohem Nikotin- und Kondensatgehalt nicht sinnvoll schien.

3.3 Ergebnisse bei der Nukleoidsedimentation

3.3.1 Gesamtdarstellung

Abb.5



Absolute Fluoreszenz in den Fraktionen
Mittelwerte aller Raucher (--) und Nichtraucher (—)
mit Standardabweichung

Tabelle 1 Absolute Fluoreszenz in den Fraktionen
Mittelwerte ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (s)

Fraktion		1	2	3	4	5	6
Raucher	$\bar{x}$	0.178	0.185	0.220	0.240	0.256	0.326
	s	0.084	0.085	0.164	0.184	0.187	0.228
Nichtr.	$\bar{x}$	0.197	0.199	0.327	0.330	0.262	0.181
	s	0.084	0.148	0.245	0.295	0.169	0.105

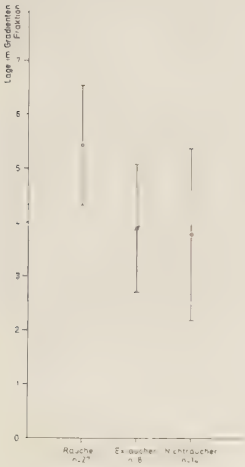
Fraktion		7	8	9	10	11	12
Raucher	$\bar{x}$	0.208	0.152	0.135	0.122	0.122	0.127
	s	0.178	0.090	0.085	0.060	0.050	0.095
Nichtr.	$\bar{x}$	0.153	0.139	0.135	0.130	0.132	0.140
	s	0.086	0.075	0.053	0.059	0.048	0.064

Diese Darstellung soll einen groben Überblick über das Ergebnis unserer Arbeit geben. Sie beinhaltet die Mittelwerte der absoluten Fluoreszenz aller Probanden in jeder Fraktion 1-12, aufgegliedert nach Rauchern und Nichtrauchern. Bei Rauchern zeigte sich eine Verschiebung der Peaks zu im Gradienten höher gelegenen Fraktionen.

3.3.2 Exraucher

Die Hälfte der Exraucher hatte erst vor $\frac{1}{2}$ Jahr und weniger aufgehört zu rauchen. Anfangs werteten wir Raucher, Exraucher und Nichtraucher in drei Gruppen aus.

Abb. 6



Beziehung zwischen
Rauchverhalten und
Lage der gemittelten
Peaks mit Standard-
abweichung

	R	EX	NR
$\bar{x}$	5.47	3.88	3.86
s	1.10	0.96	1.22

Abb. 7



Beziehung zwischen
Rauchverhalten und
Anzahl der Peaks mit
Standardabweichung

Peak	R	EX	NR	
1	10	7	10	27
>1	17	1	4	22
	27	8	14	49

Lage des längsten Peaks und Anzahl der Klumpen

	R	EX	NR		Klumpen	R	EX	NR	
$\bar{x}$	5.59	3.88	3.86		1	16	8	14	38
s	1.47	1.25	0.86		>1	11	0	0	11
						27	8	14	49

Mit diesen Werten konnten wir keinen Unterschied der Verteilung der Peaks aufzeigen. Die Berechnung des exakten Fisher-Tests ergab für Anzahl der Peaks ($p=0.76$) und Anzahl der Klumpen ($p=1.00$) keinen Unterschied zwischen Nichtrauchern und Extrauchern. Wir sahen es daher als berechtigt an, für die folgende Auswertung Extraucher und Nichtraucher zu einer Gruppe zusammenzufassen und den Rauchern gegenüberzustellen.

3.3.3 Raucher

Der Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern brachte die folgenden Resultate.

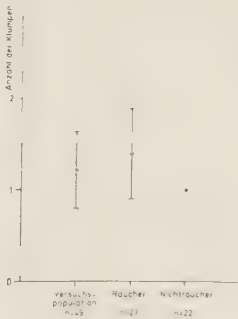
Abb.8



Beziehung zwischen Rauchverhalten und Anzahl der Peaks mit Standardabweichung

Peaks	R	NR	
1	10	17	27
>1	17	5	22
	27	22	49

Abb.9



Beziehung zwischen Rauchverhalten und Anzahl der Klumpen mit Standardabweichung

Klumpen	R	NR	
1	16	22	38
>1	11	0	11
	27	22	49

Wir verglichen die Anzahl der Peaks und Klumpen im Gradienten mit dem Rauchverhalten. Im üblichen Verfahren des exakten Fisher-Tests erhielten wir eine deutliche Zunahme

der Peaks ($p=0.01$) und der Klumpen ($p=0.0009$) in den Gradienten der Raucher.

Wir werteten die Peaks im Gradienten nach den in Kapitel 2.6 beschriebenen Kriterien aus.

Abb.10

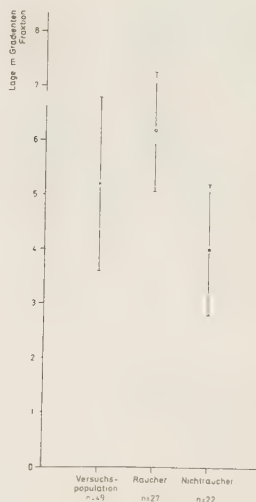


Beziehung zwischen
Rauchen und Lage des
ersten Peaks mit
Standardabweichung

	alle	R	NR
$\bar{x}$	4.18	4.19	3.73
s	1.63	1.0	1.03

Im t-Test ergaben sich leichte Hinweise auf Unterschiede zwischen R und NR mit $p=0.062$

Abb.11



Beziehung zwischen
Rauchen und Lage des
letzten Peaks mit
Standardabweichung

	alle	R	NR
$\bar{x}$	5.21	6.19	4.00
s	1.57	1.08	1.20

Im t-Test ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen R und NR mit $p=0.001$

Abb. 12



Beziehung zwischen
Rauchverhalten und
Lage des längsten
Peaks mit Standard-
abweichung

	alle	R	NR
$\bar{x}$	4.82	5.59	3.86
s	1.54	1.47	0.99

Im t-Test ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen R und NR mit $p=0.001$

Abb. 13



Beziehung zwischen
Rauchverhalten und
Lage des gemittelten
Peaks mit Standard-
abweichung

	alle	R	NR
$\bar{x}$	4.76	5.94	3.87
s	1.34	1.14	1.03

Im t-Test ergab sich ein Unterschied zwischen R und NR mit $p=0.00001$

Die Nukleotide von Rauchern sedimentierten erkennbar langsamer als die von Nichtrauchern.

3.3.4 Geschlecht

Wir untersuchten die Nukleoid-Sedimentation männlicher und weiblicher Raucher und Nichtraucher.

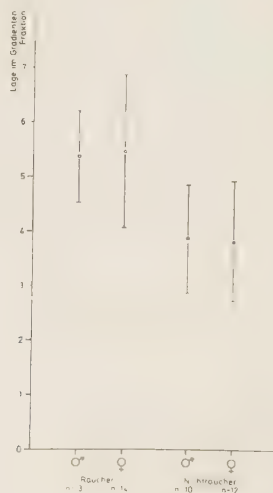
Abb.14



Beziehung zwischen Rauchverhalten, Geschlecht der Probanden und Anzahl der Peaks mit Standardabweichung

Peaks	R		NR		
	m	w	m	w	
1	6	4	7	10	27
>1	7	10	3	2	22
	13	14	10	12	49

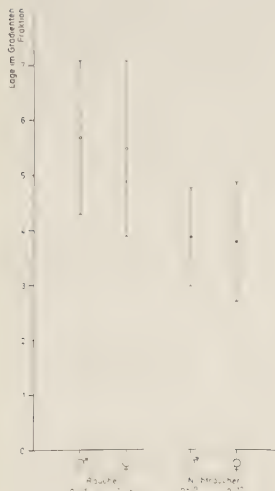
Abb.15



Beziehung zwischen Rauchverhalten, Geschlecht der Probanden und Lage des gemittelten Peaks mit Standardabweichung

	R		NR	
	m	w	m	w
$\bar{x}$	5.44	5.47	3.90	3.85
s	0.85	1.39	1.00	1.10

Abb. 16



Beziehung zwischen
Rauchverhalten, Ge-
schlecht der Probanden
und Lage des längsten Peaks
mit Standardabweichung

	R		NR	
	m	w	m	w
$\bar{x}$	5.69	5.50	3.90	3.83
s	1.38	1.61	0.88	1.07

Wir fanden keine über den Effekt des Rauchens hinausgehende Veränderung des Sedimentationsverhaltens der Nukleotide bei männlichen und weiblichen Probanden. Die Durchführung des exakten Fisher-Tests für die Anzahl der Peaks zeigte keinen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden (bei Rauchern $p=0.59$, bei Nichtrauchern $p=0.81$).

3.3.5 Zigarettenzahl und Rauchdauer

Wir teilten die Raucher nach ihrem Rauchverhalten auf in Probanden, die bis zu 10, bis zu 20 und über 20 Zigaretten am Tag rauchten und untersuchten die Lymphozyten.

Abb.17



Beziehung zwischen
täglicher Zig.-Zahl
und Anzahl der Peaks
mit Standardabweichung

Peaks	<10	<20	>20
1	5	2	3
>1	4	6	7
	9	8	10
			49

Abb.18



Beziehung zwischen
täglicher Zig.-Zahl
und Lage des längsten
Peaks mit Standardab-
weichung

	<10	<20	>20
$\bar{x}$	5.45	5.88	5.50
s	1.33	1.96	1.27

Denselben Trend wie bei diesen zwei Darstellungen fanden wir bei der Berechnung von

Anzahl der Klumpen,

Lage des gemittelten Peaks

Klumpen	<10	<20	>20	
1	7	4	5	16
>1	2	4	5	11
	9	8	10	27

	<10	<20	>20
$\bar{x}$	5.58	5.43	5.36
s	1.14	1.50	0.91

und Lage des längsten Peaks im Gradienten.

	<10	<20	>20
$\bar{x}$	5.44	5.88	5.50
s	1.33	1.96	1.27

Der exakten Kontingenztafel-Test nach Freeman/Halton für Anzahl der Peaks ($p=0.84$) und Anzahl der Klumpen ($p=0.86$) ließ keine Beziehung der Schädigung zur täglich gerauchten Zigarettenmenge sichern.

Weiterhin untersuchten wir den Einfluß der Rauchdauer auf die Nukleoid-Sedimentation.

Abb.19



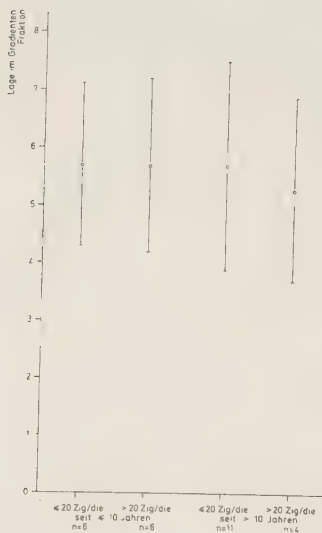
Beziehung zwischen
Dauer des Rauchens in
Jahren, täglicher Zig.-
Zahl und Anzahl der
Peaks mit Standardab-
weichung

	<10 Jahre		>10 Jahre		
Peaks	<20	>20	<20	>20	
1	4	2	3	1	10
>1	2	4	8	3	17
	6	6	11	4	27

exakter Fisher-Test

für <10 Jahre >10 Jahre
p=0.57 p=1.0

Abb.20



Beziehung zwischen
Dauer des Rauchens in
Jahren, täglicher Zig.-
Zahl und Lage des
längsten Peaks mit
Standardabweichung

	<10 Jahre		>10 Jahre		
	<20	>20	<20	>20	
$\bar{x}$	5.67	5.67	5.64	5.25	
s	1.37	1.51	1.20	0.96	

Wir führten für "Anzahl der Peaks", "Lage des längsten Peaks" und "erste und letzte Lage eines Peaks" im Gradienten eine zwei-faktorielle Varianzanalyse für gegenseitige Beeinflussung von Rauchdauer und Zigarettenzahl durch und fanden keine Beziehungen.

3.3.6 Peakhöhe

Schon während der Experimente wurde deutlich, daß die relative, auf den Median bezogene Peakhöhe keine eindeutige Beziehung zu den bisher erfaßten Einflußgrößen hat. Auch die Diskussion im Rahmen der statistischen Auswertung ließ bei dem jetzigen Stand keinen Ansatz für einen Zugang erkennen. Es muß gefragt werden, ob es immer gelungen ist, mit unserer Zählmethode eine strenge Standardisierung der Zellzahl zu gewährleisten. Die Menge an Fluoreszenzfarbstoff ist bei allen Versuchen streng ausgemessen worden.

Im Augenblick sehen wir nicht, wie aus den Werten zusätzliche Information gewonnen werden kann.

3.3.7 Langzeitbeobachtungen

Zur Einschätzung intraindividueller Unterschiede führten wir über 8 Monate Mehrfachuntersuchungen an einigen Probanden durch.

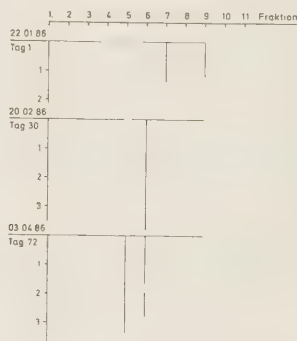
Schwankungen bei Mehrfachuntersuchungen (Lage und relativer Ausschlag der Peaks im Gradienten)

Abb.21



Proband 1, weibl., 23 J.,
Nichtraucher, klin.o.B.

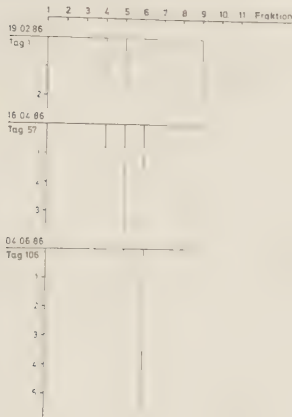
Abb.22



Proband 2, männl., 56 J.,
Nichtraucher, Langzeit-
behandlung mit nicht-
steroidalen Antirheuma-
tika, Kortison, Gold

Schwankungen bei Mehrfachuntersuchungen (Lage und relativer Ausschlag der Peaks im Gradienten)

Abb.23



Proband 11, männl., 31 J.,
30 Zig./die, klin.o.B.

Auch bei den sieben weiteren Doppeluntersuchungen zeigten sich bei den Nichtrauchern bis auf eine Schwankung in der Sedimentation um eine Fraktion keine Veränderungen. Der Proband mit rheumatoider Arthritis nahm seit vielen Jahren zeitweilig hochdosiert Antirheumatika. Der kasuistische Charakter dieser Einzelbeobachtung hat nur informatorischen Wert. Der Raucher hatte immer mehr als einen Peak und eine Mittelpeaklage, die jedesmal höher im Gradienten lag als bei dem Nichtraucher. Beim Raucher waren die Abweichungen während der Mehrfachuntersuchung größer. Den Fragebogen erhielt jeder Proband einmal am Anfang der Untersuchung. Schwankungen in der Tabak-Exposition wurden nicht erfaßt.

3.4 Fragen zu Umweltnoxen

Erklärtes Ziel der Arbeit war, eine Beziehung zwischen Rauchen und Einzelstrangbrüchen aufzuzeigen. Die Exposition gegenüber anderen bekannten Noxen konnte in diesem Zusammenhang nur kurz erfragt werden. Somit waren bei diesen Ergebnissen statistische Tests oft nicht anwendbar, es können aber Trends beschrieben werden.

3.4.1 Befinden

Dem Erfassungsbogen voran stellten wir eine Frage zur subjektiven Einschätzung der eigenen Gesundheit. Keiner der Probanden gab an, sich krank zu fühlen. Zwischen Rauchern und Nichtrauchern bestand kein wesentlicher Unterschied im subjektiven Wohlbefinden (exakter Fisher-Test $p=0.76$). Die Mehrheit der Raucher tendierte dazu, "sehr gesund" anzugeben, dabei zeigte sich der leichte Trend, daß Raucher (70%) dies etwas mehr als Nichtraucher (64%) angaben.

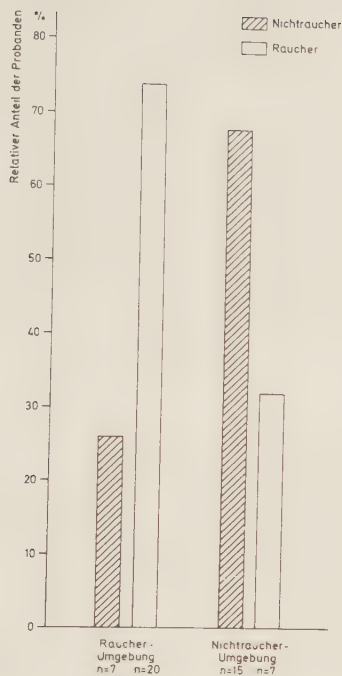
Dieses Ergebnis erschien uns nicht relevant.

3.4.2 Passivrauchen

Bis heute ist die Schadwirkung durch Inhalation des Zigarettenrauchs anderer Personen umstritten. Wir interessierten uns dafür, ob die Probanden im Arbeitsleben oder daheim regelmäßig passiver Rauchbelastung ausgesetzt sind.

Es zeigte sich, daß 74% ($n=20$) derer, die regelmäßig Zigarettenrauch ausgesetzt waren, auch selber rauchten. Demgegenüber waren die Probanden, die angaben, keine regelmäßigen Raucher in der Umgebung zu haben, zu 68% Nichtraucher. Passivrauchen und eigenes Rauchverhalten korrelierten (exakter Fisher-Test $p=0.004$).

Abb. 24



Rauchverhalten der Umgebung
in Beziehung zum Rauchverhalten der Probanden

Die Untersuchung mit der Methode der Nukleoid-Sedimentation ergab folgendes.

Abb.25

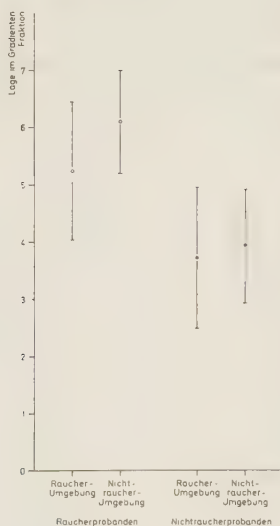


Beziehung zwischen Rauchen der Umgebung und Anzahl der Peaks mit Standardabweichung

Peaks	R-Umgeb.	NR-Umgeb.
1	12	15
>1	15	7
	27	22

exakter Fisher-Test $p=0.17$

Abb.26



Beziehung zwischen Rauchen der Umgebung, Rauchverhalten und Lage des gemittelten Peaks mit Standardabweichung

	Raucher		Nicht-r.	
Umgebung:	R	NR	R	NR
$\bar{x}$	5.23	6.11	3.74	3.94
s	1.15	0.86	1.23	0.97

Probanden, die mit regelmäßigen Rauchern lebten oder arbeiteten, hatten mehr Peaks als solche ohne passive Rauchbelastung. Die Auswertung des Effekts beim Parameter "Lage des gemittelten Peaks" macht deutlich, daß eine Schädigung dem eigenen Rauchverhalten zuzuordnen ist.

3.4.3 Genetische Belastung

Zwischen dem Rauchverhalten und Krebs- oder Infarkterkrankungen in der Familie ergab sich keine Beziehung im exakten Fisher-Test ($p=0.14$).

Eine vermehrte Schädigung der DNA der Nukleotide bei Probanden mit krebserkrankten Familienmitgliedern wurde nicht beobachtet.

3.4.4 Medikamente

Eine der Fragen behandelt die regelmäßige Einnahme von Kortison, Antirheumatika, Kontrazeptiva und Zytostatika. Während der Befragung konnten alle anderen regelmäßig eingenommenen Medikamente zusätzlich zu den aufgeführten angegeben werden; dies erfolgte in keinem Fall. Die Einnahme von Medikamenten ist bei Rauchern und Nichtraucher ähnlich (exakter Fisher-Test $p=0.40$); 32% ($n=7$) der Nichtraucherinnen und 30% ($n=8$) der Raucherinnen nahmen Kontrazeptiva, 55% ($n=12$) der Nichtraucher und 70% ($n=19$) der Raucher verneinten die regelmäßige Einnahme von Medikamenten. 14% ($n=3$) der Nichtraucher nahmen regelmäßig nicht-steroidale Antirheumatika und/oder Kortison.

3.4.5 Kaffee

Der tägliche Kaffeekonsum in Tassen betrug im Mittel $\bar{x}=4.16$, mit $s=3.16$. 14% ($n=7$) gaben an, keinen Kaffee zu

trinken, 49% (n=24) tranken weniger als fünf Tassen und 37% (n=18) mehr als oder genau fünf Tassen Kaffee am Tag. Es bestand eine leichte Korrelation zwischen der Menge des Kaffeekonsums und der Lage des längsten Peaks ($r=0.33$), des gemittelten Peaks ($r=0.25$) und des letzten Peaks ($r=0.35$), die Höhe der entsprechenden Peaks war nicht korreliert.

Für die Berechnung der zwei-faktoriellen Varianzanalyse zur Bestimmung der gegenseitigen Beeinflussung von Rauchen und Kaffee wurde die Aussage auf "Kaffee Konsum ja/nein" reduziert. Dabei zeigte sich, daß die Beziehung zwischen Rauchen und Kaffee bezüglich Anzahl der Peaks nur auf das Rauchen ($p=0.07$) und nicht auf den Kaffee ($p=0.603$) zurückzuführen ist. Eine gegenseitige Verstärkung des schädigenden Effekts war für diesen Parameter nicht aufzuzeigen.

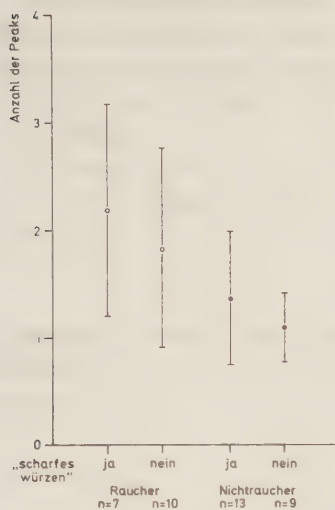
3.4.6 Würzen

Das gleiche Testverfahren wandten wir an, um eventuelle gegenseitige Verstärkung von Rauchen und dem regelmäßigen Verzehr stark gewürzter Speisen bei der DNA-Schädigung darzustellen. 61% (n=30) der Probanden gaben an, regelmäßig scharf gewürzte Speisen zu essen. Die Berechnung ergab keine Verstärkung der Schädigung durch Würzgewohnheiten zusätzlich zum Rauchen bei den Parametern "Anzahl der Peaks" (Rauchen $p=0.003$, Würzen $p=0.17$) und "Lage des längsten Peaks" (Rauchen $p=0.0001$, Würzen $p=0.25$).

Eine Beziehung zwischen dem Rauchverhalten und der Vorliebe für stark gewürzte Speisen bestand nicht (exakter Fisher-Test $p=1.0$).

Der exakte Fisher-Test ergab auch keine Korrelation zwischen Würzen der Speisen und Anzahl der Klumpen ($p=0.492$) oder Anzahl der Peaks (bei Rauchern $p=0.51$, bei Nichtrauchern $p=0.59$).

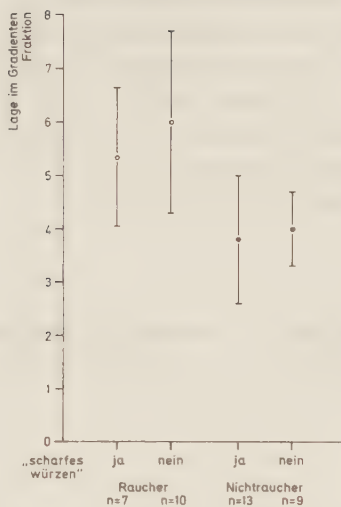
Abb. 27



Beziehung zwischen
Rauchverhalten,
"scharfem Würzen" und
Anzahl der Peaks mit
Standardabweichung

Peaks	Raucher		Nichtr.		
	j	n	j	n	
1	5	5	9	8	27
>1	12	5	4	1	22
	17	10	13	9	49

Abb. 28



Beziehung zwischen
Rauchverhalten,
"scharfem Würzen" und
Lage des längsten
Peaks mit Standard-
abweichung

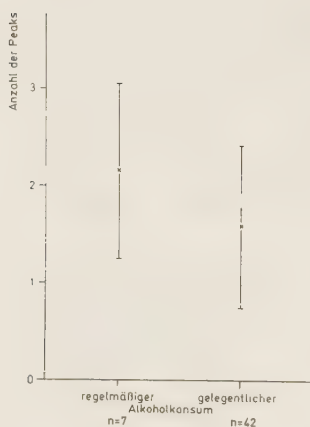
	Raucher		Nichtr.	
	j	n	j	n
$\bar{x}$	5.35	6.00	3.77	4.00
s	1.32	1.70	1.17	0.71

3.4.7 Alkohol

7 von 49 Probanden gaben an, regelmäßig Alkohol jeder Art zu trinken. Davon waren 3 Nichtraucher, 4 Raucher .

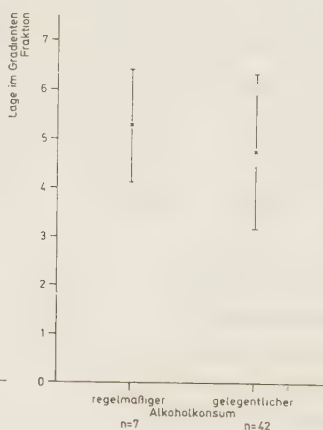
Bei der Darstellung der Beziehung zwischen regelmäßigem Alkoholkonsum und Schädigung der DNA in den Nukleoiden ergab sich folgendes Bild:

Abb.29



Beziehung zwischen
Alkoholkonsum und
Anzahl der Peaks mit
Standardabweichung

Abb.30



Beziehung zwischen
Alkoholkonsum und
Lage des längsten
Peaks mit Standard-
abweichung

Beziehung zwischen
Alkoholkonsum und
Anzahl der Peaks mit
Standardabweichung

Beziehung zwischen
Alkoholkonsum und
Lage des längsten
Peaks mit Standard-
abweichung

Peak	Alkohol		
	regelm.	gelegtl.	
1	2	25	27
>1	5	17	22
	7	42	49

	Alkohol	
	regelm.	gelegtl.
$\bar{x}$	5.29	4.74
s	1.11	1.59

Die geringe Anzahl der regelmäßig Alkohol trinkenden Probanden ließ eine Angabe von p-Werten nicht sinnvoll erscheinen.

3.4.8 Alter

Es ergab sich eine leichte Korrelation zwischen Alter der Probanden und "Lage des gemittelten Peaks" ($r=0.27$), "Lage des längsten Peaks" ($r=0.19$) und der "letzten Lage eines Peaks" ($r=0.27$).

4. Diskussion

4.1 Problemstellung

Die epidemiologischen Zusammenhänge zwischen Rauchen und Tabak-bedingten Krebsmanifestationen sind seit den klärenden Ergebnissen von Hammond 1966 dem medizinischen Allgemeinwissen zuzuordnen. Die daraus folgenden präventiven Bekämpfungsmaßnahmen, wie sie besonders im Terry-Report konsequent angestrebt wurden, haben sich bisher als nur begrenzt effizient erwiesen.

Mit Crick und Watson (1953), die als erste erkannten, daß das Erbgut in der Zelle als DNA-Doppelhelix vorliegt, wurde ein Grundstein für das Verständnis der Vorgänge auf molekularer Ebene gelegt. Obwohl man bisher unterschiedliche Mechanismen der Tumorentstehung diskutierte, konzentrieren sich die neueren Arbeiten auf die Frage der Rolle von DNA-Schäden bei der Mutagenese (Birnboim 1983, Emerit 1982).

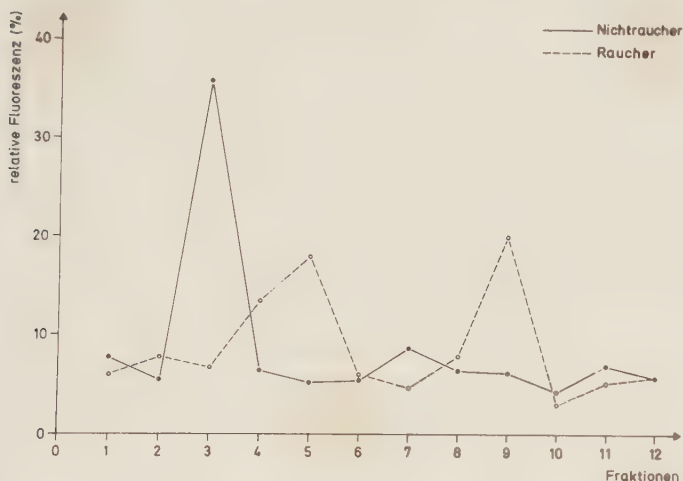
4.2 Rauchen und DNA-Schäden

4.2.1 Einzelstrangbrüche

Mit der Methode der Nukleoid-Sedimentation konnten wir eindeutig vermehrte Schäden an der DNA von Zigarettenrauchern gegenüber Nichtrauchern feststellen.

Als anschauliches Beispiel folgt hier die Darstellung der Fluoreszenz eines Rauchers und eines Nichtrauchers:

Abb.31



Beispiel für Kurvenverhalten bei einem
Raucher (--) und Nichtraucher (—)
Zig.-Raucher, männl., 31 J., klin.o.B.
Nichtraucher, männl., 16 J., klin.o.B.

Wir fanden in den Lymphozyten der Raucher eindeutig vermehrte Einzelstrangbrüche. Die Fraktionen mit erhöhter Fluoreszenz, welche das DNA-Gerüst anzeigen, sedimentierten langsamer. Bei Mehrfachpeaks konnten wir dies statistisch gesichert sowohl bei den ersten, letzten und gemittelten Peaks als auch bei dem Peak mit der höchsten Fluoreszenz im Gradienten zeigen.

Wir haben die Frage nach den Möglichkeiten einer quantifizierenden Bewertung aufgegriffen.

In einer kleinen Serie von Versuchen setzten wir unsere Lymphozyten-Präparationen definierten Röntgenstrahlen aus (vergl. 2.5) und bestimmten den Effekt mit unserer Methode. Der Mittelwert der Sedimentation unserer Zigarettenraucher entsprach dem Ergebnis einer Bestrahlung der isolierten Lymphozyten mit 0.5 Gy. Auf der Grundlage der Berechnung von van Rensburg (1985) verursachen 0.01 Gy ungefähr 10 SSB/Zelle. Wir vergleichen Einzelstrangbrüche bei ungeschützten Zellen, verursacht durch harte Röntgenstrahlen, und solche durch chronische Exposition von chemischen Noxen auf Zellen im Gewebeverband.

Nakayama et al. (1985) verglichen Rauchkondensat und Gammastrahlen als Ursache von Einzelstrangbrüchen. Sie beschränkten ihre Versuche auf Zellkulturen. Als verantwortliche Komponente bei der DNA-Schädigung identifizierten sie Hydroxylradikale, gebildet aus der durch Zigarettenrauch induzierten Reaktion von H_2O_2 und Stickoxiden (Nakayama et al. 1985, Borish et al. 1985).

Als Folge stellten sie fest, daß eine Zigarette 10^4 SSB verursacht (Nakayama et al. 1985).

Ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen wäre unzulässig, da im Gegensatz zu den Kulturversuchen bei unseren Probanden weitgehend mit der Reparatur von Schäden zu rechnen ist.

4.2.2 Schadenskombinationen

Bei Rauchern fanden wir die Anzahl der Peaks und Klumpen im Gradienten deutlich erhöht.

Peaks in zwei nebeneinander liegenden Fraktionen sind zum Teil methodische erklärbar. Beim Fraktionieren des Gradienten kann es vorkommen, daß die Nukleoid-Schicht auf zwei Fraktionen aufgeteilt wird, obwohl die Nukleotide etwa gleich tief sedimentierten.

Mehrere Klumpen, d.h.erhöhte Fluoreszenz in einer oder mehr nebeneinander liegenden Fraktionen, kamen dagegen nur bei Rauchern vor. Wir sehen das Auftreten von Klumpen im Gradienten durch verschiedene Lymphozyten-Subtypen erklärt. In unserem Experiment verwandten wir Lymphozyten aus Nativblut, die bekanntlich aus mehreren Subpopulationen, v.a. B- und T-Lymphozyten (Carson 1983), bestehen. Ein Unterschied dieser Gruppen in der DNA-Superstruktur nach der Schädigung (van Rensburg et al. 1985) oder durch die Reparatur (Yew et al. 1978.) erscheint plausibel.

Lipetz et al. (1982) konnten mit der Nukleoid-Sedimentation Subtypen nicht trennen. Das gleiche gilt für Weniger (1982), der mit der Methode selbst bestrahlte nicht von unbestrahlten Zellen in einem Gradienten trennte.

Wir halten es für denkbar, daß diese Ergebnisse mit der Verwendung von Zellkulturen zusammenhängen.

Die selben Peak-Konfigurationen wie beim Rauchen fanden wir bei der Bestrahlung mit 1.5 Gy. Unterschiedliche Schäden an B- und T-Lymphozyten sind auch von Röntgenstrahlen bekannt. B-Lymphozyten (van Rensburg et al. 1985) und T-Suppressor-Zellen (Huddlestone et al. 1983) sind besonders strahlenempfindlich.

4.3 Wirkmechanismen

4.3.1 Die komplexe Noxe Tabakkondensat

Die vorliegende Arbeit sieht ihr Ziel im Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen bei Probanden, die dem Risikofaktor Rauchen ausgesetzt sind. Es ist offensichtlich, daß bei einer komplexen Mischung wie Tabakkondensat (Banbury-Report, Hoffmann 1986) synergistische Effekte der etwa 3000 Chemikalien, die bisher im Tabakrauch quantifiziert wurden (Belinsky 1986), zu beachten sind. Als Wirkmechanismus der Entstehung von Einzelstrangbrüchen sollen einige besonders bedeutende Einzelnoxe herausgestellt und diskutiert werden. Hopkin und Evans (1979) bemerkten, daß die DNA-Schädigung, verursacht durch 0.5 mg Kondensat (1/80 des Kondensats einer Zigarette) 2.5 µg Benz-a-Pyren (BaP) (aus dem Rauch von 50-250 Zigaretten) entspricht. Sie folgerten daraus, daß die DNA-Schäden beim Zigarettenrauchen nicht von BaP allein kommen können, auch nicht durch einfache Addition der Wirkung verschiedener Schadstoffgruppen.

Auch andere Studien untersuchten die Anzahl von Sister-chromatid-exchange (SCE) als Anzeiger von DNA-Schäden. Die meisten Autoren fanden vermehrt SCE bei den Lymphozyten von Zigarettenrauchern (Dewdney et al. 1986, Hopkin und Evans 1979, 1980), teilweise auch mit einer Dosis-Wirkungs-Relation (Wulf et al. 1983, Lunberg et al. 1983).

4.3.2 Benz-a-Pyren

1977 zeigten Yamasaki und Ames, daß Urin von Rauchern im Gegensatz zu dem von Nichtrauchern mutagen ist. Wynder und Hoffmann stellten 1967 die Inhaltsstoffe von Tabak, Tabakrauch und -kondensat zusammen. Sie sicherten das Vorkommen von aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH), vor

allem Benz-a-Pyren (BaP), im Tabak und fanden zusätzlich eine Abhängigkeit der Menge an BaP im Tabakrauchkondensat vom Rauchverhalten (Rauchzüge, Kippenlänge). BaP ist aber auch eine weit verbreitete Umwelttoxine mit hoher mutagener Potenz (Gamper et al. 1977). Seine Aktivität ist abhängig von der metabolischen Aktivierung durch das Cytochrom P450-abhängige Enzym Aryl-hydrocarbon-hydroxylase (Conney 1982). Die interindividuellen Unterschiede in diesem Metabolismus sollen später angesprochen werden.

Als ultimates Karzinogen wird 7,8-Dihydrodiol-9,10-epoxid angesehen. DNA-Addukte mit diesem Metaboliten gelten als letztlich ursächlich für die Karzinogenität dieser Noxe (Hubeimann und Sachs 1974, 1977). Man stellt sich dabei vor, daß das BaP-Diolepoxid Einzelstrangbrüche durch Phosphortriester-Hydrolyse des DNA-Rückgrats verursacht (Gamper et al. 1977).

Bei Zigarettenrauchern fanden sich gegenüber Nichtrauchern vermehrt DNA-BaP-Addukte (Shamsuddin 1985), ebenso bei Patienten mit Bronchialkarzinom (Hawke et al. 1986).

4.3.3 Nitrosamine

Nitrosamine finden sich sowohl im Tabak als auch im Zigarettenrauch, weniger hingegen im Zigarren- und Pfeifenrauch (Gamper et al. 1977). Die durchschnittliche Exposition von Nitrosaminen (NS) ist durch Zigarettenrauchen bis zum Faktor 10 höher als durch kritische Lebensmittel (zit.n. Hoffmann 1985).

NS entstehen durch Nitrosierung aus Nikotin und anderen Alkaloiden, die sich in Tabakprodukten befinden (Hoffmann 1985). Die wichtigsten NS im Tabak sind das 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und N-Nitrosornornicotin (NNN) (Hoffmann 1985). NNK findet sich in hoher Konzentration im Haupt- und Nebenstrom (Hoffmann et al. 1979).

Nach Belinsky (1986) werden Nitrosamine enzymatisch zu elektrophilen Intermediaten umstrukturiert, die mit den nukleophilen DNA-Basen reagieren. Das entstehende O-Methyl-Guanin gilt als Promutagen (Hoffmann 1985). Die alkylierte Stelle der DNA wird von der Zelle repariert; durch fehlerhafte Reparatur kann es zu Mutationen kommen (Collins et al. 1981). Über die Bedeutung der Reparatur ist später zu sprechen.

Das Nikotin als Ausgangsprodukt der Nitrosamin-Bildung ist die Grundlage der Abhängigkeit des regelmäßigen Rauchers. Versuche einer Schadstoffreduktion werden durch Änderung des Rauchverhaltens ausgeglichen (Hoffmann 1985).

4.3.4 Grenzen des Reparaturmechanismus

DeMarini (1983) wies nach, daß Zigarettenrauchkondensat zu einer Hemmung des Reparatursystems führt. Die Nukleoid-Sedimentation stellt eine empfindliche Nachweismethode für DNA-Schäden durch fehlerhafte Reparatur dar (Weniger 1982).

Einzelstrangbrüche (SSB) entstehen während der Reparatur durch enzymatische Inzision bei Basen- oder Nukleotid-Exzisionsreparatur, während der Postreplikationsreparatur oder der Rekombinationsreparatur (Bradley et al. 1982). Für das Entstehen von Doppelstrangbrüchen (DSB) sind in der Regel energiereiche ionisierende Strahlen verantwortlich; diese sind aber auch als Reparaturschaden bekannt (Dugle et al. 1975, Obe et al. 1982). DSB entstehen auch, wenn interkalierende Substanzen das Reparatur-Enzym Topoisomerase II während der Relaxation supergetwisteter DNA hemmen (Mattern et al. 1982, Pommier et al. 1984, 1985).

Es gibt auch eine fehlerhafte Reparatur (SOS-Reparatur), als deren Ursache der recA-lex-Genotyp

angesehen wird (Witkin 1975, Bresler 1975). Bei gehäuft auftretenden DNA-Schäden werden im Rahmen der "SOS-Antwort" diese Gene aktiviert, um vermehrt Reparaturenzyme zu bilden (Meyn et al. 1977). Dabei treten aber auch DNA-Polymerasen auf, die Mutationen in die DNA einbauen (Bressler 1975, Witkin 1975, Hanawalt 1975).

Kimball (1980) ist der Meinung, daß diese bisher nur bei Bakterien nachgewiesene SOS-Reparatur auch auf Säuger übertragen werden kann. Meyn et al (1977) stellten fest, daß die meisten Karzinogene dieses "SOS-System" induzieren, wobei Kimball (1980) eine Schwellendosis vermutet. Denkbar ist zusätzlich der Einfluß eines clastogenetischen Faktors, der in Lymphozyten, induziert z.B. durch Röntgenstrahlen, über Hydroxylradikale Einzelstrangbrüche verursacht (Emerit 1982).

Für die Entstehung Tabak-bezogener Karzinome ist damit sowohl das Modell der direkten DNA-Schädigung durch Karzinogene als auch der fehlerhaften Reparatur dieser Schäden denkbar.

4.4 Konstitutionelle Faktoren

4.4.1 Genetik

In dieser Arbeit konnten wir keine Erhöhung der Einzelstrangbruch-Rate bei Probanden feststellen, in deren Familie gehäuft maligne Tumoren bekannt waren.

Nicht jeder Zigarettenraucher erkrankt am Bronchialkarzinom. Zusätzlich zum Lebensstil hat auf dem genetischen Level der Metabolismus von Benz-a-Pyren zum ultimalen Karzinogen durch das Enzymsystem der mischfunktionellen Oxidasen, v.a. durch Aryl-hydrocarbon-hydroxylase (AHH), einen wichtigen Einfluß (Conney 1982).

Ein Anzeiger für das Risiko von Krebs kann eine hohe AHH-Aktivität sein (Kouri et al. 1982, Ayesh et al. 1984). Die weiße Bevölkerung kann in drei Gruppen geteilt

werden mit tiefer (44.7%), mittlerer (45.4%) und hoher (9.4%) AHH-Aktivität (Kellermann et al. 1973). Die Enzyme des MFO-System sind induzierbar durch verschiedene Medikamente, Chemikalien und Nahrungsbestandteile (Conney 1982, Levine et al. 1984) und Zigarettenrauch (DeMarini 1983).

Eine genetische Steuerung vermutet man auch bei Radiosensitivität (Sandford et al. 1986) und Aktivität der "natural killer cells" (Strayer et al. 1984, Phillipp et al. 1985), die bei der Immunreaktion gegen maligne Entartung eine Rolle spielen.

4.4.2 Geschlecht

Zwischen männlichen und weiblichen Probanden konnten wir mit der Nukleoid-Sedimentation keinen Unterschied in der Anzahl der Einzelstrangbrüche feststellen.

Für SCE fanden Dewdney et al. (1986) und Margolin et al. (1985) bei Frauen mehr Schäden, Livingstone et al. (1983) erhielten keine Unterschiede.

4.4.3 Alter

Mit zunehmendem Alter zeigten sich bei unseren Probanden vermehrt Einzelstrangbrüche. Diese Beobachtung wird in der Literatur bestätigt (Marlhens et al. 1986, Lipetz et al. 1982), Zahn et al. (1981) untersuchten SSB mit dem Elektronenmikroskop. Bekannt ist, daß die Inzidenz - v.a. der epithelialen Karzinome - proportional mit dem Alter steigt (Doll 1963, 1978). Ebbesen (1984) faßte zusammen, daß im Alter die Krebsinzidenz erhöht ist, weil eine Neoplasie erst nach 10-30% der Lebensspanne zu einem manifesten Tumor wird, und weil Charakteristika des Alterns, wie Abnahme der DNA-Reparatur und der Immunfunktion, eine Tumor-Induktion erleichtern.

4.5 Rauchmenge

Die DNA-Schädigung einiger Raucher war gegenüber Nicht-raucherprobanden nicht vermehrt. Auch konnten wir keine Beziehung zwischen Rauchdauer und -menge und Anzahl der Einzelstrangbrüche feststellen. Unsere Probandengruppe war nicht groß genug, um bei einer über Raucher und Nichtraucher hinausgehenden Gliederung noch deutliche Unterschiede erwarten zu lassen. Nach Wynder und Stellman (1977) hat die Rauchdosis einen größeren Einfluß auf die Karzinogenese als die Rauchdauer. Als Erklärung hierfür ist das oben erwähnte Schwellenmodell für die "SOS-Reparatur" denkbar.

4.6 Filterzigaretten

In unserer Population fanden sich nur Raucher von Filterzigaretten. Quantitative Unterschiede der DNA-Schädigung durch Rauchen von Filterzigaretten oder "leichten Zigaretten" konnten wir nicht messen. Übereinstimmende Aussagen über eine Gefahrenreduktion durch Filter liegen nicht vor. Lubin et al. (1984) beschrieben für Raucher von leichten und Filterzigaretten ein gering reduziertes Risiko, an Bronchialkarzinom zu erkranken. Eine epidemiologische Studie zeigte dagegen, daß Raucher von Filterzigaretten früher starben als andere Raucher (zit. n. Miller 1985).

Einen größeren protektiven Effekt scheint reduzierter Kondensatgehalt bei der Ausbildung eines Ösophaguskarzinoms zu haben (LaVecchia et al. 1986).

Bisherige Studien zeigen jedoch, daß die Reduktion der Zigarettenzahl oder der Wechsel zu "leichten Zigaretten" eine geringere Schadstoffreduktion bringt als allgemein erwartet (Benowitz et al. 1986), da der Raucher durch verstärkte Inhalation den gewohnten Nikotinspiegel zu

erreichen sucht (Stellman 1986, Benowitz et al. 1983, Hoffmann 1983). Dabei würde er auch wieder mehr Kondensat und N-Nitrosamine aufnehmen (Wynder und Hoffmann 1967). Miller (1985) folgerte, daß die "gefahrenärmere Zigarette eine tödlich Täuschung" sei.

4.7 Exraucher

Obwohl 4 der Exraucher bei der Blutentnahme erst seit $\frac{1}{2}$ Jahr und weniger nicht mehr rauchten, konnten wir keine unterschiedliche Anzahl der Einzelstrangbrüche gegenüber Nichtrauchern aufzeigen. Zu diskutieren ist, ob bei einem durchschnittlichen Alter der Exraucher von 28.6 Jahren die Rauchdauer dieser Probanden lang genug war, um eine bleibende Schädigung zu verursachen. Die Raucher rauchten zu 44% erst seit 10 Jahren oder weniger und wiesen dennoch vermehrt SSB auf.

Unterschiedliche Quellen geben an, daß das Risiko für Bronchialkarzinom bei Exrauchern erst nach etwa 5 (Damberg et al. 1986, Doll 1978) bis 15 Jahren (Lubin et al. 1984) dem der Nichtraucher entspricht.

Wahrscheinlich ist, daß mit der Nukleoid-Sedimentation Akutschäden nachgewiesen werden, die prinzipiell repariert werden können und erst bei einer Überlastung des Reparatursystems durch die Replikation manifest werden. Vergleichbare Ergebnisse werden von Tsereas (1987) mit der SCE-Methode beschrieben.

4.8 Passivrauchen

Wir konnten bei unserer Zusammenstellung der Probanden keine Schadwirkung durch Passivrauchen belegen. Wir beobachteten, daß Raucher mehr Kontakt zu rauchenden Mitmenschen haben als Nichtraucher.

Obwohl sich die Hinweise auf die Gefährlichkeit des Passivrauchens mehren, bleiben die dazu vorgetragenen Befunde kontrovers. Hirayama (1981) und Trichopoulos et al. (1981) stellten 1981 als erste ein erhöhtes Bronchialkarzinomrisiko bei Passivrauchern fest. Diese beiden Studien wurden wegen ihrer Methodik vielfach kritisiert, lösten aber eine Serie von Folgestudien aus. Garfinkel (1981) konnte kein erhöhtes Risiko feststellen, Correa (1983), Sandler (1985), Kabat und Wynder (1984), Dalager et al. (1986), Garfinkel et al. (1985) und Koo et al. (1987) fanden eine erhöhte Korrelation zwischen Passivrauchern und verschiedenen Karzinomen.

Nach einer Zusammenfassung von Blot et al. (1986) ist bei starkem Passivrauchen das relative Risiko für Lungenkrebs 1.7. Vor allem Passivrauchen am Arbeitsplatz erhöht das Risiko des Lungenkarzinoms (Repace 1985).

Bisher fehlt für Passivrauchen wie vor 20 Jahren für das Rauchen der genaue Nachweis der Schädigung auf der Basis der DNA. Unsere Methode bewährte sich bei Rauchern und zeigte deutliche Unterschiede auf. Ein vergleichbares Vorgehen mit einem größeren Kollektiv von Passivrauchern verspricht neue Informationen.

4.9 Andere Umweltnoxen

4.9.1 Ernährung

Nach Doll und Peto (1981) verursachen mit der Nahrung aufgenommene Substanzen 35% der Tumortodesfälle. Im Rahmen unserer Befragung war es nicht möglich, Essensgewohnheiten der Probanden detailliert zu erfassen. Unsere gezielte Frage nach dem Würzen ließ sich statistisch nicht auswerten.

In vielen Nahrungsmitteln wurden Karzinogene (Sasson et al. 1985) und Antikarzinogene (Ames 1983) gefunden. Vor allem für β -Carotin, Ascorbinsäure, rohes Gemüse und

Ballaststoffe wird ein protektiver Effekt diskutiert (Peto et al. 1981, Gold et al. 1985). Auf der Suche nach Inhibitoren der chemischen Karzinogenese hat man bisher keine für die Prävention relevanten Ergebnisse erzielt (Wattenberg 1978). Carr (1985) faßte zusammen, daß unsere Nahrung aus einer Mischung von Förderern und Hemmern der Karzinogenese besteht, und daß es bisher nicht erwiesen ist, daß veränderte Ernährungsgewohnheiten vor Karzinomen schützen.

4.9.2 Alkohol

Die Anzahl der Probanden, die angaben, regelmäßig Alkohol zu trinken, ließ sich statistisch nicht verwerten. Der Synergismus von Alkohol und Rauchen bei Karzinomen des oberen Verdauungstraktes gilt als weitgehend gesichert (Elwood et al. 1984, Wynder und Stellman 1977). Unklar ist allerdings noch, ob Alkohol unabhängig karzinogen wirkt (Elwood et al. 1984, Herity et al. 1981) oder als Promoter nach DNA-Schädigung durch Zigarettenrauchen (Wynder und Stellman 1977). Speziell für Whiskey wurde mutagene Aktivität beschrieben (Sugimura 1983).

4.9.3 Kaffee

Wir konnten eine leichte Korrelation zwischen der Anzahl der Einzelstrangbrüche und dem täglichen Kaffeekonsum feststellen. Von anderer Seite wurden genotoxische Inhaltsstoffe im Kaffee gefunden (Dunn 1985), darunter Koffein, ein Inhibitor der DNA-Reparatur (Painter 1975, Downes et al. 1983, Natarajan 1982). Bei Kaffee, als Bohne oder Instantverarbeitung, wurde mutagene Aktivität nachgewiesen (Sugimura 1983). Zusammengefaßt nach Zahn (1985) enthält Kaffee sowohl Karzinogene als auch Antikarzinogene.

4.9.4 Medikamente

Wegen der geringen Zahl der Probanden, die regelmäßig Medikamente einnahmen, erhielten wir keine statistisch auswertbaren Ergebnisse über die DNA-Schädigung. Ob die langfristige Einnahme von Kontrazeptiva ein erhöhtes Risiko, an malignen Neoplasien zu erkranken, verursachen kann, ist bis heute nicht sicher. Bisherige Ergebnisse sind widersprüchlich (Reitz und Gutjahr 1983, Hoover 1981, Longman 1987).

Drei unserer Probanden nahmen regelmäßig Antirheumatika ein. Emerit (1982) fand bei rheumatischer Arthritis vermehrt Chromosomenbrüche. In einer in unserem Arbeitskreis erstellten Studie wird dieser Frage gezielt nachgegangen - offenbar mit positivem Ergebnis (Lorei 1987). Prior (1985) beschrieb ein erhöhtes Risiko für Krebs bei rheumatischer Arthritis unabhängig von der Einnahme von Immunsuppressiva oder zytotoxischen Medikamenten. Nach der Einnahme von Kortikosteroiden wurde tierexperimentell eine Hemmung der morphologischen Transformation von Zellen durch BaP und UV-Strahlen erzielt (Greiner 1982). Aspirin wirkte im Tiermodell als Ko-Karzinogen (Hasegawa et al. 1984).

Zytostatika wurden von keinem der Probanden eingenommen. Ein regelmäßiger Umgang mit Zytostatika lag nicht vor. Untersuchungen bei Klinikpersonal, das mit Zytostatika umging, ergaben in mehreren Studien erhöhte Mutagenität im Urin (Nguyen et al. 1982, Bos 1983, Dunn 1985).

5. Methodische Perspektiven *)

5.1 Ansätze für die Routine-Anwendung

Unsere ersten Ergebnisse erschienen uns so vielversprechend, daß wir sie zur Grundlage eines Antrags an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) machten.

Von einer kontinuierlichen Fluoreszenzmessung mit einem Durchfluß-Fluorimeter versprochen wir uns einerseits ein verbessertes Auflösungsvermögen, andererseits durch die automatisierte Messung eine Reduktion zufälliger Fehler. Darüber hinaus wollten wir die Voraussetzung für eine unter epidemiologischen Gesichtspunkten notwendige größere Probandenzahl durch beschleunigten Arbeitsablauf vorbereiten.

5.2 Anpassung der Methodik

5.2.1 Fluoreszenzmessung

Der mit dem Antrag verbundene Zeitablauf führte dazu, daß die vorgelegte Arbeit abgeschlossen und ausgewertet war, als der Antrag genehmigt und das Gerät ausgeliefert wurde.

Es war uns ein besonderes Anliegen, die unter Kapitel 2 beschriebene Methodik der Nukleoid-Sedimentation auf das neue Gerät zu übertragen und damit vor allem die Möglichkeit der Anwendung für Screening-Untersuchungen von Risikogruppen und -substanzen aufzuzeigen.

*) Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen wurden aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Genehmigung vom 05.01.1987, Az.: Za 6/29-1).

Wir wandelten die Methodik in den folgenden 2 Punkten ab:

- * da bei dem Durchflußprinzip der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Diamidino-phenylindol) nicht mehr ausreichend einwirken konnte, maßen wir die Fluoreszenz der DNA mit EB (Ethidium-Bromid) bei 546 nm Anregung und 590 nm Transmission. Dieses befand sich als Interkalierungshilfe routinemäßig im Gradienten.
- * Probleme mit der Eigenfluoreszenz der Lyse-Lösung reduzierten wir, indem wir das Volumen der Lyse-Lösung um die Hälfte verringerten. Das entsprechend notwendige kleinere Zellvolumen wurde durch Erhöhung der Konzentration erreicht (1 Mio. Lymphozyten/50 µl NaCl).

Diese Veränderungen reichten aus, um eindeutige Ergebnisse mit dem HPLC-Fluoreszenz-Detektor Typ GAT RF 530 zu erzielen. Das für die HPLC-Methodik entwickelte und bewährte Gerät ist für uns in seiner Eigenschaft als hochempfindliches Durchfluß-Fluorimeter für Folgestudien einsatzbereit.

5.2.2 Entnahmetechnik

Gleichzeitig mit dem neuen Fluoreszenz-Detektor stand uns ein auf Anregung von Zahn gebautes Entnahmegerät nach dem Prinzip des "meniscus-followers" zur Verfügung. Damit wird der Gradient luftfrei vom oberen Meniskus entnommen. Die 1. Fraktion entspricht hierbei, im Gegensatz zu der im Kapitel 2 beschriebenen Methodik, der im Gradienten zuoberst liegenden.

5.3 Typische Meßergebnisse

In 15 Versuchen arbeiteten wir an der Anpassung der Methodik. Dabei wurde mit Lymphozyten von 5 der 49 bereits untersuchten Probanden experimentiert. Die Probanden wa-

ren zwei Raucher und drei Nichtraucher. Die Ergebnisse der neuen Meßmethodik kontrollierten wir mit der herkömmlichen Technik und erhielten weitgehend vergleichbare Ergebnisse.

Zur Veranschaulichung folgen zwei Abbildungen von typischen Meßergebnissen bei Rauchern und Nichtrauchern. Im Gegensatz zu den Darstellungen der Fluoreszenz in den einzelnen Fraktionen zeigen diese Originalkurven die absolute Fluoreszenz über den gesamten Gradienten.

Absolute Fluoreszenz im Gradienten

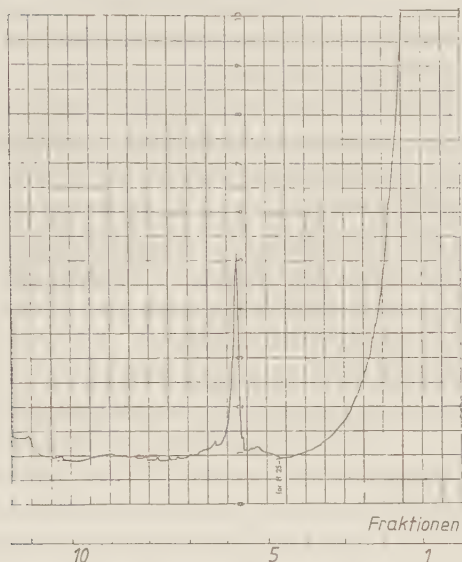
Abb.32



Prob.8, weibl., 42 J.,
Raucher, 10 Zig./die, klin.o.B.

Absolute Fluoreszenz im Gradienten

Abb.33



Prob.1, weibl., 23 J.,
Nichtraucher, klin.o.B.

Der gegenüber den Darstellungen aus Kapitel 3 optisch andere Aspekt der Ergebnisse könnte irritieren; tatsächlich entsprechen aber die Peaks der Kurven nach Lage und Höhe weitgehend den Gradienten der fraktioniert gemessenen Werte. Die Abbildung 32 zeigt deutlich die erwartete besser differenzierbare Auflösung der Peaks der geschädigten Nukleotide gegenüber der homogenen Verteilung bei einem Nichtraucher (Abb.33).

Der vereinfachte Versuchsablauf hat wie erhofft eine vielseitige Anwendung für Fragestellungen vergleichbarer Art ermöglicht.

6. Zusammenfassung

Die Methode der Nukleoid-Sedimentation hat sich zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen bewährt.

Die Aufdrillung der DNA durch Einzelstrangbrüche führt bei geeigneter Präparation zu einer Verzögerung der Sedimentation in der Ultrazentrifuge, von Zahn (1985) anschaulich mit dem Effekt eines retardierenden Fallschirms verglichen. Wir setzten die abgewandelte Methode am gesunden Menschen ein. Im Hinblick auf die Häufigkeit des Bronchialkarzinoms und des Rauchens als sicher bekannter Risikofaktor wollten wir nachweisen, daß bereits primäre DNA-Schäden empfindlich nachgewiesen werden können.

Wir verglichen eine Gruppe von 27 Rauchern und 22 Nichtrauchern. Bei Rauchern zeigte sich eine verlangsamte Sedimentationsgeschwindigkeit; die Fraktionen mit der durch Fluoreszenz darstellbaren und meßbaren Nukleotide lagen im Gradienten höher als bei Nichtrauchern. Dieser Befund geht parallel mit dem Auftreten von Peakkombinationen (Mehrfachpeaks und Klumpen). Mehr als ein Klumpen wurde nur bei Rauchern gefunden. Die Ergebnisse wurden einer statistischen Kontrolle unterzogen und erwiesen sich als eindeutig. Da das Rauchen keineswegs die einzige Krebsnoxen ist, und wir auch bei gesunden, nichtrauchenden Probanden von der Anwesenheit anderer exogener und endogener Karzinogene ausgehen müssen, ist dieser eindeutige Befund eine Bestätigung der besonderen Bedeutung des Rauchens. Andererseits konnten wir als Nebenergebnisse, wiederum statistisch gesichert, weitere karzinogene Faktoren demonstrieren. So konnten wir durch Röntgenbestrahlung von isolierten Lymphozyten ein Sedimentationsbild aufzeigen, das dem typischen Raucherbild entspricht. Die Altersverteilung hatte ihren Schwerpunkt bei jüngeren Probanden. Trotzdem zeigte sich eine leichte Korrelation zwischen der Anzahl der Einzelstrangbrüche und dem Alter.

Mit der Höhe des Kaffeekonsums stieg die Zahl der Einzelstrangbrüche ebenfalls.

Von Bedeutung für die Bewertung der Methode sind die Verlaufskontrollen von einigen Probanden bis zu acht Monaten, die durchaus vergleichbare Ergebnisse erbrachten. Wir hatten den Eindruck, daß sich bei unserem Modell der klinisch gesunden Probanden akkumulierte Schäden, z.B. verursacht durch längere Rauchdauer und hohe Zigarettenzahl, gegenüber akuten Schäden nicht genügend abgrenzen lassen, vielleicht wegen der relativ niedrig liegenden Nachweisgrenze der empfindlichen Methodik.

Exraucher konnten wir von Nichtrauchern nicht trennen;

Passivraucher ließen sich nicht hinreichend abgrenzen.

Auch andere karzinogen-verdächtige Substanzen, die wir während der Studie besonders im Auge hatten, ohne sie als Schwerpunkt einzubauen, wie etwa das Würzen, Alkohol und Kontrazeptiva, ließen sich nicht objektivieren.

Basierend auf den bisherigen Versuchen wurde ein DFG-Antrag genehmigt. In einer ergänzenden Versuchsserie wurde unsere Methodik soweit abgewandelt, daß sie nunmehr mit einem Durchfluß-Fluorimeter für die vereinfachte und beschleunigte Anwendung im epidemiologischen Maßstab bei der Suche nach weniger bekannten Karzinogenen eingesetzt werden kann.

Mit der beschriebenen Methodik und unseren Ergebnissen hoffen wir, einen kleinen Schritt zur Klärung der Zusammenhänge bei der Karzinogenese und der Bekämpfung von Krebs anzubieten.

7. Literatur

1. Abel,U., Über die zukünftige Entwicklung der Bronchialkrebsmortalität in der Bundesrepublik Deutschland, Öff. Gesundh.-Wes. 47 (1985), 1-5
2. Ames,B., Driston,W.E., Yamesaki,E. Lee,F.D., Carcinogens are mutagens: A simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc.Natl.Acad.Sci. 70 (1973), 2281-2285
3. Ames,B., Dietary carcinogenes and anticarcinogenes. Oxygen radicals and degenerative diseases, Science 221 (4617) (1983), 1256-1264.
4. Ames, B., Magaw, R., Gold, L.S., Ranking possible carcinogenic hazards, Science 236 (1987), 271-280
5. Austin,H., Delzell,E., Grufferman,S., Levine,R., Morrison,A.S., Stolley,P.D., Cole,P., A case-control study of hepatocellular carcinoma and the Hepatitis B Virus, cigarette smoking, and alcohol consumption, Cancer Res. 46 (1986), 962-966
6. Ayesh,R., Idle,J.R., Ritchie,J.C., Crothers,M.J., Hetzel,M.R., Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer,Nature 312 (1984), 169-170
7. Basler,J., Hastie,N.D., Pietras,D., Matsui,S.I., Sandberg,A.A., Berezney,R., Hybridization of nuclear matrix attached Deoxyribonucleic Acid fragments, Biochemistry 20 (1981), 6921-6929
8. Belinsky,S.A., White,C.M., Boucheron,J.A., Richardson,F.C., Swenberg,J.A., Anderson,M., Accumulation and persistence of DNA adducts in respiratory tissue of rats following multiple administrations of the tobacco specific carcinogen 4-(n-methyl-n-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, Cancer Res. 46 (1986), 1280-1284

9. Bender,M.A., Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, in: Generoso et al., DNA repair and mutagenesis in eukaryotes, Basis Life Science 15 (1980), 245-265
10. Benhamou,E., Benhamou,E., Tirmarche,M.,Flamant,R., Lung cancer and use of cigarettes: A french case-control study, JNCI 74, (1985), 1172-1175
11. Benowitz,N.L., et al., Smokers of low-yield cigarettes do not consume less nicotine, N. Engl. J. Med. 309, (1983), 139-142
12. Benowitz,N.L., Jacob III,P.,Kozlowski,L.T.,Yu,L., Influence of smoking fewer cigarettes on exposure to tar, nicotine, and carbon monoxide, N. Engl. J. Med. 315, (1986), 1310-1313
13. Birnboim,H.C., Jevcak,J.J., Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation, Cancer Res. 41 (1981), 1889-1892
14. Birnboim,H.H., Importance of DNA strand-break damage in tumor promotion, in: Nygaard,D.F. et al., Radioprotectors and anticarcinogens, Academic Press, N.Y.,(1983), 539-557
15. Bishop,J.M., Proto-Oncogenes: Clues to the puzzle of purpose, Nature Bd.316 (1985), 483
16. Bishop,J.M., The molecular genetics of cancer, Science 235 (1987), 305-311
17. Blot,W.J.,Fraumeni,J.F., Passive smoking and lung cancer, JNCI 77, (1986), 993-1000
18. Böyum,A., Separation of leukocytes from blood and bone marrow, Canadien J of Clin. Laboratory Investigation 21 Supl. (1968), 97

19. Borish,E.T., Cosgrove,J.P., Church,D.F., Deutsch,W., Pryor,W.A.,Cigarette tar causes single-strand breaks in DNA, Biochem. Biophys. Res. Comm. 133 (1985), 780-786
20. Bos,R.P., Theuws,J.L.G., Henderson,P.T., Influence of smoking on urinary mutagenicity after occupational exposure to cytostatic drugs, Mut. Res. 113 (1983), 235
21. Bradley,M.O., Dysart,G., Fitzsimmons,K., Harbach,P., Lewin,J., Wolf,G., Measurements by filter elution of DNA single- and double-strand breaks in rat Hepatocytes: effects of nitrosamines and y-irradiation, Cancer Res. 42 (1982), 2592-2597
22. Bresler,S.E., Theory of misrepair mutagenesis, Mut. Res. 29 (1975), 467-472
23. Brugere,J.,Guanel,P., Leclerc,A., Rodriguez,J., Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx ,and mouth, Cancer 57 (1986), 391-395
24. Brunk,C.F., Jones,K.C., James,T.W., Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates, Anal. Biochem. 92 (1979), 497-500
25. Carr,B.I., Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet, Cancer 55 (1985), 218-224
26. Carson,D.A., Composition and biochemistry of lymphocytes and plasma cells, in: Williams et al., Hematology, 3.Ed., N.Y. (1983), 903-907
27. Centers for Disease Control, Cigarette smoking in the United States, 1986, MMWR 36 (1987), 581-585
28. Cerutti, P.A., Prooxidant states and tumor promotion, Science 227 (1985), 375-381

29. Collins,A.R.S., Ord,M.J., Johnson,R.T., Correlations of DNA damage and repair with nuclear and chromosomal damage in HeLa Cells caused by methylnitrosamides, Cancer Res. 41 (1981), 5176-5187
30. Conney,A.H., Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes memorial lecture, Cancer Res. 42 (1982), 4875-4917
31. Cook,P.R., Brazell,I.A., Supercoils in human DNA, J.Cell Sci. 19 (1975), 261-279
32. Cook,P.R., Brazell,I.A., Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA, Nature 263 (1976), 679-682
33. Cook,P.R., Brazell,I.A., Conformational constraints in nuclear DNA, J.Cell Sci. 22 (1976), 287-302
34. Cook,P.R., Brazell,I.A., Jost,E., Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA, J.Cell Sci. 22 (1976), 303-324
35. Cook,P.R., Brazell,I.A., Pawsey,S.A., Giannelli,F., Changes induced by ultraviolet light in the superhelical DNA of lymphocytes from subjects with xeroderma pigmentosum and normal controls, J. Cell Sci. 29 (1978), 117-127
36. Cook,P.R., Brazell,I.A., Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei, Eur. J. Biochem. 84 (1978), 465-477
37. Correa,P., Pickle,L.W., Mason,T.J. et al., Passive smoking and lung cancer, Lancet 1983, 2, 595-597
38. Dalager,N.A. et al., The relation of passive smoking to lung cancer, Cancer Res. 46 (1986), 4808-4811

39. Damber,L.A., Larsson,L.G., Smoking and lung cancer with special regard to type of smoking and type of cancer. A case-control study in north Sweden, Brit. J. Cancer 53 (1986), 673-681
40. Daniell,H.W., More advanced colonic cancer among smokers, Cancer 58 (1986), 784-787
41. DeMarini,D.M., Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate, Mutat. Res. 114 (1983), 59-89
42. Dewdney,R.S., Lovell,D.P., Jenkinson,P.C., Anderson,D., Variation in sister-chromatid exchange among 106 members of the general U.K.population, Mut. Res. 171 (1986), 43-51
43. Doll,R., Hill,A.B., A study of aetiology of carcinoma of the lung, Brit. Med. J. (1952), 2, 1282-1285
44. Doll,R.,Intepretations of epidemiologic data, Cancer Res. 23 (1963), 1613-1623
45. Doll,R., Peto,R., Mortality in relation to smoking: 20 years'observations on male British doctors,Brit.Med.J. (1976),2, 1525-1536
46. Doll,R., An epidemiological perspective of the biology of cancer, Cancer Res. 38 (1978), 3573-3583
47. Doll,R., Peto,R.,Avoidable risks of cancer in the U.S., JNCI 66 (1981), 1194-1308
48. Downes, C.S., Collins,A.R.S., Johnson, R.T., International workshop on inhibition of DNA repair,Mut. Res. 112 (1983), 75-83
49. Dugle,D.L., Gillespie,C.J., Kinetics of the single-strand repair mechanism in mammalian cells, in: Molecular mechanisms for repair of DNA, Part A and B, Basic Life Science 1975, 685-687

50. Dunn, B.P., Curtis, J.R., Clastogenic agents in the urine of coffee drinkers and cigarette smokers, *Mut. Res.* 147 (1985), 179-188
51. Ebbesen, P., Cancer and normal ageing, *Mech. Ageing Dev.* 25 (1984), 269-283
52. Elwood, J.M., Pearson, J.C.G., Skippen, D.H., Jackson, S.M., Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx, *Int. J. Cancer* 34 (1984), 603-612
53. Emerit, I., Chromosome breakage factors: Origin and possible significance, *Prog. Mut. Res.* 4 (1982), 61-74
54. Farber, E., The multistep nature of cancer development, *Cancer Res.* 44 (1984), 4217-4223
55. Fielding, J.E., Smoking: Health effects and control, *N. Engl. J. Med.* 313 (1985) 491-498 und 555-565
56. Freeman, G.H., Halton, J.H., Note on an exact treatment of contingency, goodness of fit and other problems of significance, *Biometrika* 38 (1951) 141-149
57. Friedberg, E.C., Anderson, C.T.M., Bonura, T., Cone, R., Radany, E.H., Reynolds, R.J., Recent developments in the enzymology of excision repair of DNA, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 26 (1981), 197-215
58. Fuks et al., Long term effects of radiation on T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with HD, *J. Clin. Invest.* 58 (1976), 803-814
59. Fung, Y.-K., Murphree, A., Qian, J., Hinrichs, S.H., Benedict, W.F., Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene, *Science* 236 (1987), 1657-1661

60. Gamper,H.B.,Tung, A.S.C.,Straub,K.,Bartholomew,
J.C.,Calvin,M.,DNA strand scission by benzo
(a)pyrene diol epoxides, Science 197 (1977) 671-674
61. Ganesan, A.K., Cooper, P.K., Hanawalt, P.C.,
Smith,C.A., Biochemical mechanisms and genetic
control of DNA repair, Prog. Mut. Res. 4 (1982),
313-323
62. Garfinkel,L., Time trends in lung cancer mortality
among nonsmokers and a note on passive smoking, JNCI
66 (1981), 1061-1066
63. Garfinkel,L., Auerbach,O.,Joubert,L., Involuntary
smoking and lung cancer: A case-control study, JNCI
75 (1985), 463-469
64. Gold,E.B. et al. Diet and other risk factors for
cancer of the pancreas, Cancer 55 (1985), 460-467
65. Gonzalez,C.A., et al. Occupation, tobacco use,
coffee, and bladder cancer in the county of Mataro
(Spain), Cancer 55 (1985), 2031-2034
66. Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D., Moses,
H.L., Growth factors and cancer, Cancer Res. 46
(1986), 1015-1029
67. Green, A.R., Wyke, J.A., Anti-onkogenes, A subset of
regulatory genes involved in carcinogenesis?, The
Lancet 31.8.1985, 475-477
68. Greiner,J.W., Evans,C.H., Temporal dynamics of
cortisol and dexamethasone prevention of benzo(a)
pyrene-induced morphological transformation of
syrian hamster cells, Cancer Res. 42 (1982),
4014-4017
69. Hammond,E.C., Smoking in relation to death rates in
one million men and women, Nat. Cancer Inst. Monogr.
No 19 (1966)
70. Hammond,E.C., Seidman,H., Smoking and cancer in the
United States, Prev. Med. 9 (1980), 169-173

71. Hanawalt,P., Repair models and mechanisms: Overview,
in: Molecular mechanisms for repair of DNA,
Part A und B, Basic Life Science (1975), 421-430
72. Hanawalt,P. et al., Repair, Replication in bacteria
and human cells, Progress in Nucleid Acid Research
and Molec. Biology, 26 (1981), 194-195
73. Hart,R.W., Setlow,R.B., Correlation between
deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span
in a number of mammalian species, Proc. Nat.
Acad.Sci. 71 (1974), 2169-2173
74. Hartge,P., Hoover,R., Kantor,A., Bladder cancer risk
and pipes, cigars, and smokeless tobacco, Cancer 55
(1985), 901-906
75. Hartwig,M., Matthes,E., Arnold,W., Extremely
underwound chromosomal DNA from a series of tumor
cells, Studia biophysica, Berlin, 79 (1980), 17-18
76. Hasegawa,R., St.John,M., Murasaki,G., Fukushima,S.,
Cohen,S.M., Effect of aspirin on n-(4-(5-nitro-2-
furyl)-2-thiazolyl)-formamide induced epithelial
proliferation in the urinary bladder and fore-
stomach of the rat, Cancer Lett. 21 (1984),269
77. Hawke,L.J., Farrell,G.C., Increased binding of
benzo(a)pyrene metabolites to lymphocytes from
patients with lung cancer, Cancer Lett. 30
(1986), 289-297
78. Henschler,D., Passivrauchen am Arbeitsplatz,
Deutsche Forschungsgemeinschaft, VCH Weinheim (1985)
5-33
79. Herity,B., Moriarty,M., Bourke,G.J., Daly,L.
A case-control study of head and neck cancer in the
Republic of Ireland, Brit. J. Cancer 43 (1981),
179-182

80. Hirayama,T., Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer, a study from Japan, Brit. Med. J. 282 (1981), 183-185
81. Hoffmann,D., Hecht,S.S.,Haley,N.J., Brunnemann,K.D., Adams,J.D., Wynder,E.L., Tobacco carcinogenesis: metabolic studies in humans, aus: Harris,C.C., Autrup,H.N., Human carcinogenesis, Academic Press 1982, 809-832
82. Hoffmann,D., Lavoie,E.J., Hecht,S.S., Nicotine: a precursor for carcinogens, Cancer Lett. 26 (1985), 67-75
83. Hoffmann,D., Adams,J.D., Brunnemann,K.D., Hecht,S.S., Assessment of tobacco specific N-nitrosamines in tobacco products, Cancer Res. 39 (1979), 2505-2509
84. Hoffmann,D., Harris,C.C., Mechanisms in tobacco carcinogens, Banbury-Report 1986, series 23
85. Hoffmann,D., Hecht,S.S., Nicotine derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions, Cancer Res. 45 (1985), 935-944
86. Hoover,R., Fraumeni,J.F., Drug-induced cancer, Cancer 47 (1981), 1071-1080
87. Hopkin,J.M., Evans,H.J., Cigarette smoke condensates damage DNA in human lymphocytes, Nature 279 (1979), 241-242
88. Hopkin,J.M., Evans,H.J., Cigarette smoke-induced DNA damage and lung cancer risks, Nature 283 (1980), 388-390
89. Howe,G.R. et al., Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer, JNCI, 64 (1980), 701-712

90. Huberman,E., Sachs,L., Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens, *Int.J.Cancer* 13 (1974), 326-333
91. Huberman,E., Sachs,L., DNA binding and its relationship to carcinogenesis by different polycyclic hydrocarbons, *Int.J.Cancer* 19 (1977), 122-127
92. Huddlestons,J.R., Chisari,F.V., Function of lymphocytes and plasma cells in immunity, in: Williams et al., *Hematology*, 3.Ed.,N.Y. 1983, 915-922
93. Johnson, B.E. et al., *myc* Family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course, *Journ. Clin. Invest.* 79 (1987), 1629-1634
94. Kabat,E.C., Wynder,E.L., Lung cancer in nonsmokers, *Cancer* 53 (1970), 1105-1112
95. Kahn,H.A., The dorn study of smoking and mortality among US-veterans; report on eight and one half years of observation, *Natl.Cancer Inst. Monogr.* 19 (1966), 1-125
96. Kellermann,G., Shaw,C.R., Luyten-Kellermann,M., Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 289 (1973) 934-937
97. Kelsey,K.T., Christiani,D.C., Little,J.B., Enhancement of benzo(a)pyrene-induced sister chromatid exchanges in lymphocytes from cigarette smokers occupationally exposed to asbestos, *JNCI* 77 (1986) 321-327
98. Kimball,R.F., Relationship between repair processes and mutation induction in bacteria, in: Generoso et al. *DNA repair and mutagenesis in eukaryotes*, *Basic Life Sciences* 15, Plenum Press 1980, 1-22
99. Klein, G., The approaching era of the tumor suppressor genes, *Science* 238 (1987), 1539-1545

100. Klein,G., Klein,E. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology, *Nature* 315 (1985), 190-195
101. Kohn,K.W., Erickson,L.C., Ewig,R.A.G., Friedman,C.A. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution, *Biochemistry* 15 (1976), 4629-4637
102. Koo,L.C., Ho,J.H.C., Saw,D., Ho,C.Y., Measurements of passive smoking and estimates of lung cancer risk among non-smoking chinese females, *Int.J.Cancer* 39 (1987), 162-169
103. Kouri,R.E., Mc Kinney,C.E., Slomiany,D.J., Snodgrass,D.R., Wray,N.P., Mc Lomere,T.L., Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes, *Cancer Res.* 42 (1982), 5030-5036
104. La Vecchia,C., Liati,P., Decarli,A., Negrello,I., Francescsi,S., Tar yields of cigarettes and the risk of oesophageal cancer, *Int.J.Cancer* 38 (1986) 381-85
105. Levine,A.S., Mc Kinney,C.E., Echelberger,C.K., Kouri,R.E., Edwards,B.K., Nebert,D.W., Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility among primary relatives of children with leukemia or solid tumors, *Cancer Res.* 22 (1984), 358-362
106. Lieberman,M.W., Analyses of DNA excision repair in chromatin, *Prog. Mut. Res.* 4 (1982), 103-111
107. Lipetz,P.D., Brash,D.E., Joseph,L.B. Jewett,H.D., Lisle,D.R., Lantry,L.E., Hart,R.W., Stephens,R.E., Determination of DNA superhelicity and extremely low levels of DNA strand breaks in low numbers of non-radiolabeled cells by DNA-4.6 diamidino-2-phenylindole fluorescence in nucleoid gradients, *Anal. Biochem.* 121 (1982), 339-348

108. Livingston,G.K., Fineman,R.M., Correlation of human lymphocyte SCE frequency with smoking history, *Mutat. Res.* 119 (1983), 59-64
109. Loeb,L.A., Ernster,V.L., Warner,K.E., Abbotts,J., Laszlo,J., Smoking and lung cancer: an overview, *Cancer Res.* 44 (1984), 5939-5958
110. Longman,S.M., Buehring,G.C., Oral contraceptives and breast cancer, *Cancer* 59 (1987), 281-287
111. Lorei,W., 1987, persönliche Mitteilung
112. Lubin,J.H., Blot,W.J., Berrino,F., Flamant,R., Gillis,C.R., Kunze,N., Schmähl,D., Visco,G., Modifying risk of developing lung cancer by changing habits of cigarette smoking, *Brit. Med. J.* 288 (1984), 1953-1956
113. Lundberg,M.S., Livingston,G.K., Sister-chromatid exchange frequency in lymphocytes of smoking and non smoking mothers and their newborn infants, *Mutat. Res.* 121 (1983), 241-246
114. Mabuchi,K., Bross,D.S., Kessler,I.I., Cigarette smoking and nasopharyngeal carcinoma, *Cancer* 55 (1985), 2874-2876
115. Mack,T.M., Yu,M.C., Hanisch,R., Henderson,B.E., Pancreas cancer and smoking, beverage consumption, and past medical history, *JNCI* 76 (1986), 49-60
116. Margolin,B.H., Shelby,M.D., Sister chromatid exchanges: A reexamination of the evidence for sex and race differences in humans, *Environ. Mutagen.* 7 (1985), 63-72
117. Marlhens,F., Achkar,W.A., Aurias,A., Couturier,J., Dutrillaux,A.M. et al., The rate of chromosome breakage is age dependent in lymphocytes of adult controls, *Hum. Genet.* 73 (1986), 290-297

118. Mattern,M.R., Paone,R.F., Day,R.S., Eukaryotic DNA repair is blocked at different steps by inhibitors of DNA topoisomerases and of DNA polymerases and β , *Biochim. Biophys. Acta.* 697 (1982), 6-13
119. Meyn,M.S., Rossman,T., Troll,W., A protease inhibitor blocks SOS functions in *Escherichia coli*: Antipain prevents λ repressor inactivation, ultraviolet mutagenesis, and filamentous growth, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (1977), 1152-1156
120. Michaelis,J., *Medizinische Statistik und Informationsverarbeitung*, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York (1980)
121. Miller,E.C., Miller,J.A., Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules, *Cancer* 47 (1981), 2327-2345
122. Miller,G.H., The "less hazardous" cigarette: a deadly delusion, *N.Y. State J. Med.* (1985) 313-317
123. Mori,W., Sakai,R., A study on chronologic change of the relationship between cigarette smoking and lung cancer based on autopsy diagnosis, *Cancer* 54 (1984), 1038-1042
124. Mullinger,A.M., Johnson,R.T., The organization of supercoiled DNA from human chromosomes, *J. Cell Sci.* 38 (1979), 369-389
125. Nakayama,T., Kaneko,M., Kodama,M., Nagata,C., Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells, *Nature* 314 (1985), 462-464
126. Natarajan,A.T., Csukas,I., Degraasi,F., van Zeeland,A.A., Palitti,F., Tanzarella,C., de Salvia,R., Fiore,M., Influence of inhibition of repair enzymes on the induction of chromosomal aberrations by physical and chemical agents, *Prog. Mut. Res.* 4 (1982), 47-59

127. Nguyen,T.V., Theiss,J.C., Matney,T.S., Exposure of pharmacy personnel to mutagenic antineoplastic drugs, Cancer Res. 42 (1982), 4792-4796
128. Nomura,A., Heilbrun,L.K., Stemmermann,G.N., Prospective study of coffee consumption and the risk of cancer, JNCI 76 (1986), 587-590
129. Obe,G., Natarajan,A.T., Palitti,F., Role of DNA double-strand breaks in the formation of radiation-induced chromosomal aberrations, Prog. Mut. Res. 4 (1982), 1-9
130. Painter,R.B., Repair in mammalian cells: Overview, Molecular Mechanisms for Repair of DNA, Part A und B, Basic Life Science (1975), 595-600
131. Peto,R., Doll, R., Buckley,J.D., Sporn, M.B., Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?, Nature 92 (1981), 201-208
132. Phillips,B., Marshall,M.E., Brown,S., Thompson,J.S., Effect of smoking on human natural killer cell activity, Cancer 56 (1985), 2789-2792
133. Pommier, Y., Schwartz, R.E., Kohn, K.W., Zwelling, L.A., Formation and rejoining of desoxyribonucleic acid double-strand breaks induced in isolated cell nuclei by antineoplastic intercalating agents, Biochemistry 23 (1984), 3194-3201
134. Pommier,Y., Zwelling, L.A., Kao-Shan, C-S., Whang-Peng,J., Bradley,M.O., Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in chinese hamster cells, Cancer Res. 45 (1985), 3143-3149
135. Prior,P., Cancer and rheumatoid arthritis: Epidemiologic considerations, Amer. J. MED. 78 (1985), 15-21

136. Redmond,D.E., Tobacco and cancer: the first clinical report, 1761, N. Engl. J. Med. 282 (1970), 18-23
137. Reitz,M., Gutjahr,P., aus: Krebs, was ist das? Ullstein Sachbuch, Berlin 1983, 34-42
138. vanRensburg,E.J., Louw,W.K.A., Izatt,H., van der Watt,J.J., DNA supercoiled domains and radiosensitivity of subpopulations of human peripheral blood lymphocytes, Int. J. Radiat. Biol. 47 (1985), 673-679
139. Repace,J.L., Lowrey,A.H., An indoor air quality standard for ambient tobacco smoke based on carcinogenic risk, N.Y.State J.Med. 1985, 381-383
140. Rosenberg,L. et al., Breast cancer and cigarette smoking, N.Engl.J.Med. 310 (1984), 92-94
141. Sandler,D.P., Everson,R.B., Wilcox,A.J., Passive smoking in adulthood and cancer risk, Amer. J. Epidemiol. 121 (1985), 37-48
142. Sanford,K.K. et al., Chromosomal radiosensitivity during the G cell cycle period and cytopathology of human normal x tumor cell hybrids, Cancer Res. 46 (1986), 2045-2049
143. Sasson, I.M., Coleman, D.T., LaVoie, E.J., Hoffmann, D., Wynder E.L., Mutagens in human urine: effects of cigarette smoking and diet, Mutat. Res. 158 (1985), 149-157
144. Schächter,N.T., Miller,A.B., Howe, G.R., Cigarette smoking and breast cancer: case-control study of screening program participants, Amer. J. Epidemiol. 121 (1985), 479-487
145. Schmährl,D., Chemische Carcinogene und ihre Bedeutung für die Krebsentstehung beim Menschen, aus:Schmährl,D., Maligne Tumoren Entstehung-Wachstum-Chemotherapie, Editio Cantor Aulendorf 1981, 289-321

146. Schmidt,F., Zwangsrauchen und Krebs, Med.Klin. 74 (1979), 1967-1973
147. Setlow,R.B., Relationship among repair, cancer, and genetic deficiency: Overview, in: Molecular mechanisms for repair of DNA, Part A+B, Basic Life Science 1975, 711-717
148. Setlow,R.B., Repair deficient human disorders and cancer, Nature 271 (1978), 713-717
149. Setlow,R.B., DNA repair pathways, in: Generoso et al., DNA repair and mutagenesis in eukaryotes, Basic Life Science 15 (1980), 45-54
150. Shamsuddin,A.K.M., Sinopoli,L.T., Hemminki,K., Boesch,R.R., Harris,C.C., Detection of benzo(a)pyrene: DNA adducts in human white blood cells, Cancer Res. 45 (1985), 66-68
151. Sinden,R.R., Pettijohn,D.E., Chromosomes in living Escherichiacoli cells are segregated into domains of supercoiling, Proc.Natl.Acad.Sci. 78 (1981), 224-228
152. Soemmering,S.T., De morbis vasorum absorbentium corporis humani, Traiecti ad moenum 1795, 104-117
153. Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 1985 Stuttgart und Mainz 1985
154. Stellman,S.D., Garfinkel,L., Smoking habits and tar levels in a new American Cancer Society prospective study of 1,2 million men and women, JNCI. 76 (1986), 1057-1063
155. Strayer,D.R., Carter,W.A., Mayberry,S.D., Pequignot,E., Brodsky,I., Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer, Cancer Res. 44 (1984), 370-374

156. Stüber,J., Ein echtes in Vitro Testsystem zur Erfassung des nukleolytischen und genotoxischen Umweltpotentials, Dissertationsarbeit, Mainz 1986
157. Sugimura,T., Sato,S., Mutagens-carcinogens in foods, Cancer Res. 43 (1983), 2415-2421)
158. Tennant, R.W. et al., Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays, Science 236 (1987), 933-941
159. Trepel,F., Die lymphatischen Zellen, in: Queißer, Das Knochenmark, Thieme, Stuttgart 1978, 108-127
160. Trichopoulos,D., Kalandidi,A., Sperros,L., Lung cancer and passive smoking, Int. J. Cancer 27 (1981), 1-4
161. Trichopoulos,D. et al., Hepatitis B-virus, tobacco smoking and ethanol consumption in the etiology of hepatocellular carcinoma, Int. J. Cancer 39 (1987), 45-49
162. Tsereas,S., Verlaufskontrolle des spontanen und chemisch in vitro durch -Naphthoflavon induzierten Schwesterchromatidaustausches bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen während der Gestation, Dissertationsarbeit, Mainz 1987
163. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, The health consequences of smoking, a public health service review 1967
164. Wagner,G., Epidemiologie des Krebses, in: Gross, Schmidt, Klinische Onkologie, Thieme Stuttgart 1986,
165. Watson,J.D., Crick,F.H.C., Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid, Nature 171 (1953), 737-738
166. Wattenberg,L.W., Inhibition of chemical carcinogenesis, JNCI 60 (1978), 11-18

167. Weir,J.M., Dunn,J.E., Smoking and mortality; a
prospektive study, Cancer 25 (1970), 1105-1112
168. Weinberg,R.A., he action of oncogenes in the
cytoplasm and nucleus, Science 230 (1985), 770-776
169. Weniger,P., Nucleoid sedimentation as a test system
for DNA repair after different types of DNA damage,
Prog.Mut.Res. 4 (1982), 261-265
170. Witkin,E.M., Relationships among repair,
mutagenesis, and survival: Overview,
Molecular mechanisms for repair of DNA, Part A&B,
Basic Life Sciences (1975)
171. Wittig,B., Rauchgewohnheiten an einem
Großstadt-Gymnasium, Praxis der Naturwissenschaften
- Biologie (1984), 216-221
172. Wu,A.H., Henderson,B.E., Pike,M.C., Yu,M.C., Smoking
and other risk factors for lung cancer in women.
JNCI 71 (1985), 747-751
173. Wulf,H.C., Husum,B., Niebuhr,E., SCE in smokers of
cigarettes, cheroots, pipe tobacco and cannabis,
Mutat. Res. 113 (1983), 320
174. Wynder,E.L.,Hoffmann,D.,Tobacco and tobacco smoker,
New York, London 1967
175. Wynder,E.L.,Stellman,S.D., Comparative epidemiology
of tobacco-related cancers, Cancer Res. 37 (1977),
4608-4622
176. Wynder,E.L., Hall,N.E.L., Polanski,N., Epidemiology
of coffee and pancreatic cancer, Cancer Res.
43 (1983), 3900-3906
177. Yamasaki,E., Ames,B.N., Concentration of mutagens
from urine by adsorption with the nonpolar resin
XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine,
Proc.Natl.Acad.Sci. 74 (1977), 3555-3559

178. Yew, F.-H., Johnson, R.T., Ultraviolet-induced DNA excision repair in human B and T lymphocytes. III. Repair in lymphocytes from chronic lymphocytic leukaemia, J.Cell Sci. 39 (1979), 329-337
179. Yew, F.-H., Johnson, R.T., Human B and T lymphocytes differ in UV-induced repair capacity, Exp.Cell Res. 113 (1978), 227-231
180. Yu, M.C., Mack, T.M., Hanisch, R., Cicioni, C., Henderson, B.E., Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma, JNCI 77 (1986), 351- 356
181. Zahn, R.K., Müller, W.E.G., Kurelec, B., Rijavec, M., Michaelis, M.L., Single strand nicks: Cause or consequence of environmental damage or ageing, Res. Mol.Biol. 10 (1981), 20-54
182. Zahn, R.K., Die Bestimmung von Desoxyribonuclein-säure-Veränderungen, Pers. Mitteilung 1985
183. Zahn, R.K., Über physische Umweltrisiken, Akademie der Wissenschaften und der Literatur. Abhandlungen der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse 3 (1985), Mainz 1985
184. Zahn, R.K., Nachweismethoden von DNA-Alterationen, persönliche Mitteilung 1986
185. Zhestyanikov, V.D., DNA repair and cell repair, Prog. Mut.Res. 4 (1982), 325-335

Materialien

Merck (Darmstadt)	Tris-hydroxymethyl-aminomethan Saccharose Ethidium-Bromid Nr.11615 EDTA Titriplex III Ethylendinitro- ilotetraessigsäure
Serva (Heidelberg)	Triton x-100 Octylphenol-poly- ethylenglykolether DAPI 4,6-Diamidino-2-phenylindol Nr. 18860
Seromed	Ficoll-Trennlösung, Dichte 1.077
Braun (Melsungen)	Heparin Natrium 5000
Zentrifugen:	
Heraeus Christ (Osterode)	Minifuge 2
Beckman (Frankfurt)	Modell L5-65 Ultrazentrifuge Rotor SW 40Ti
Fluorimeter:	
Carl Zeiss	Spektro-Fluorimeter PM Q 3
GAT (Bremerhaven)	Fluoreszenz-Detektor Typ Shimadzu RF 530
GAT (Bremerhaven)	Flachbettschreiber Modell GAT-2001

Abkürzungen

AHH	Aryl Hydrocarbon Hydroxylase
BaP	Benz-a-Pyren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DSB	Doppelstrangbruch
EB	Ethidium-Bromid
EDTA	Äthylendinitroilotetraessigsäure
NNK	4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	N-Nitrosornikotin
NS	Nitrosamine
RCF	relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
SCE	Sister-chromatid-exchange
SSB	Einzelstrangbruch
Tris-Puffer	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton x-100	Octylphenol-polyethylenglykolether

Danksagungen

Herrn Prof.Dr.R.K.Zahn danke ich für die Anregung und Förderung über den gesamten Verlauf der Untersuchungen. Die ständige Bereitschaft von Herrn Dr.M.Reitz zur beratenden Unterstützung war mir eine unschätzbare Hilfe. Herrn Dr.M.Berres danke ich für seinen Einsatz und seine Unterstützung bei der Analyse und Bewertung der Ergebnisse. Für die abschließende statistische Beratung bedanke ich mich bei Herrn Prof.Hommel.

Frau Dr.P.Beyermann half mir bei der Gewinnung der Probanden, Herr Prof.Dr.Kuhn beriet mich bei den Bestrahlungsversuchen und Herr Dr.Donsbach bei der Erstellung des Erhebungsbogens.

Die technische Assistenz von Herrn Beyer, Frau E.Lambert und Frau P.Fischer, verbunden mit großer Erfahrung, war sehr hilfreich.

Herrn Lenz danke ich für die Unterstützung bei der Literatursuche in der Bibliothek des Tumorzentrums.

Frau E.Haas danke ich für die Erstellungen der Graphiken.

Frau R.Dittmann half mir bei der Blutentnahme.

Lebenslauf

Am 30.08.1963 wurde ich als 2. Tochter des Akademischen Direktors Herrn Dr.med Johannes Raphael Wittig und seiner Frau Dr.med Agnes Wittig, geborene Hambsch, in Heidelberg geboren.

1967 zogen wir um nach Mainz.

1969 wurde ich in die Grundschule eingeschult.

1973 kam ich in die 5. Klasse des Staatlichen Gymnasiums Mainz-Gonsenheim. Dort belegte ich 1979 ab der 11. Klasse Mathematik, Englisch und Biologie als Leistungsfächer.

1979 trat ich ins Deutsche Rote Kreuz, Ortsverein Mainz, ein. Seit 1980 bin ich als Sanitäter im 3.Sanitätszug Mainz-Weisenau für den Katastrophenschutz und die Mitarbeit im Rettungsdienst verpflichtet.

Im Juni 1982 beendete ich das Gymnasium mit dem Abitur.

Seit Oktober 1982 bin ich an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz als Student der Medizin immatrikuliert.

Im August 1984 legte ich das Physikum ab, im August 1985 das 1.Staatsexamen. Im August 1987 bestand ich das 2.Staatsexamen.

Seit 1983 werde ich regelmäßig für Nachtwachen in der 1.Medizinischen Klinik der Mainzer Universität herangezogen. Famulaturen machte ich in der Schmerzklinik Mainz, Radiologie im St.Vinzenz Krankenhaus Mainz, in einer internistischen Praxis im Mainz-Hechtsheim und einer unfallchirurgischen Praxis in Mainz.

Seit November 1987 arbeite ich im Rahmen des Praktischen Jahrs in den Universitätskliniken Mainz.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

Ich versichere, daß die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt wurde und ich mich keiner anderen als der von mir angegebenen Literatur bedient habe.
Im Rahmen einer Prüfung wurde das Thema von mir noch nicht schriftlich bearbeitet.

Mainz- Hechtsheim, den 28.10.1987

